



Universidad Autónoma de Madrid  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM/CSIC)  
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras  
(CIBERER/ISCIII)



# Caracterización de los transportadores mitocondriales de ATP-Mg/Pi y su implicación en la señalización por calcio a la mitocondria

Memoria presentada por el licenciado

**Javier Traba Domínguez**

para optar el grado de Doctor en Biología Molecular  
por la Universidad Autónoma de Madrid

Directoras de Tesis:

Dra. Jorgina Satrústegui Gil-Delgado

Dra. Araceli del Arco Martínez

Madrid, Noviembre de 2009



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Doctora Jorgina Satrústegui Gil-Delgado, Catedrática del Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM/CSIC), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. Parte de este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor Michael R. Duchon, en el Department of Cell and Developmental Biology, University College London, Londres, Reino Unido.





<b>ÍNDICE</b>	<b>i</b>
Índice de figuras	v
Índice de tablas	ix
Abreviaturas	xi
Summary	xv
 <b>Introducción</b>	 <b>1</b>
1. La mitocondria	3
2. Transportadores mitocondriales	3
- 2.1) Mecanismo de transporte en los transportadores mitocondriales	7
- 2.2) Transportadores de nucleótidos de adenina en la mitocondria	10
2.2.1. Transportadores de ADP/ATP	10
2.2.2. Transportadores de ATP-Mg/Pi	12
- 2.3) Transportadores mitocondriales dependientes de calcio	13
3. El calcio como segundo mensajero en la mitocondria	16
- 3.1) Transporte de calcio en la mitocondria	18
3.1.1. Sistemas de llenado de $\text{Ca}^{2+}$ : uniportador de $\text{Ca}^{2+}$ (CaU)	18
3.1.2. Sistemas de eflujo de $\text{Ca}^{2+}$	19
- 3.2) Señalización por calcio a la mitocondria a través de los CaMCs	19
- 3.3) Señalización por calcio a la mitocondria de levadura	20
4. Poro de transición de permeabilidad (PTP)	20
- 4.1) Reguladores del PTP	20
- 4.2) Componentes moleculares del PTP	22
- 4.3) Implicación del PTP en apoptosis o necrosis	23
- 4.4) Particularidades de la mitocondria de levadura	23
 <b>Objetivos</b>	 <b>25</b>
 <b>Materiales y métodos</b>	 <b>29</b>
1. Experimentos con levaduras	31
- 1.1) Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
- 1.2) Medios de cultivo de levaduras	31

- 1.3) Construcción de plásmidos de expresión de la luciferasa	32
- 1.4) Aislamiento de mitocondrias de levadura	34
- 1.5) Subfraccionamiento de la mitocondria	35
- 1.6) Detección de proteínas mediante western blot	36
- 1.7) Inmunofluorescencia en levaduras	36
- 1.8) Medidas de ATP en mitocondrias procedentes de levaduras que expresan la luciferasa mitocondrial	37
- 1.9) Determinación de la concentración de calcio libre en los medios	37
- 1.10) Calibración de la luciferasa recombinante	38
- 1.11) Permeabilización de las mitocondrias de levadura	39
- 1.12) Medidas de ATP mitocondrial in vivo en células intactas	39
- 1.13) Cinética de generación de yemas en la levadura	40
2. Experimentos con animales	41
- 2.1) Mantenimiento de animales y genotipado	41
- 2.2) Aislamiento de mitocondrias de cerebro e hígado de ratón	42
- 2.3) Detección de proteínas mediante western blot	43
- 2.4) Medida de la captura de $\text{Ca}^{2+}$ en mitocondria aislada	43
- 2.5) Medida del hinchamiento por apertura del PTP en mitocondria aislada	43
- 2.6) Transporte de nucleótidos de adenina en mitocondrias de hígado	44
3. Experimentos con líneas celulares	45
- 3.1) Cultivo de células y transfecciones	45
- 3.2) Análisis por inmunofluorescencia	45
- 3.3) Construcción del vector para eliminar la expresión de SCaMC-1	45
- 3.4) Medida del potencial de membrana mitocondrial en células intactas	48
- 3.5) Medida de la respiración en células intactas	48
- 3.6) Medida de los niveles de calcio en células utilizando aequorina	49
- 3.7) Generación del vector de expresión de la luciferasa mitocondrial	49
- 3.8) Aislamiento de mitocondrias de células en cultivo	50
- 3.9) Medida de ATP en mitocondrias aisladas de líneas celulares	51
<b>Resultados</b>	<b>53</b>
1. Caracterización del transportador de ATP-Mg/Pi en levaduras, Sal1p	55
- 1.1) Características y expresión de la SCaMC en levadura	55
- 1.2) Expresión y localización subcelular de la luciferasa	57

- 1.3) Calibración de la luciferasa mitocondrial	59
- 1.4) La luciferasa mitocondrial es capaz de medir la síntesis de ATP por fosforilación oxidativa en mitocondria aislada	60
- 1.5) Sal1p es un transportador de ATP y su actividad depende de $\text{Ca}^{2+}$	61
- 1.6) El transporte de ATP depende de magnesio y fosfato	62
- 1.7) El ADP también es sustrato de Sal1p, pero el transporte de ADP no depende de magnesio	63
- 1.8) Sal1p y AACs como sistemas de importe de ATP en mitocondrias de levadura	65
- 1.9) Las señales de calcio inducidas por glucosa activan Sal1p <i>in vivo</i>	67
- 1.10) La mitocondria de levaduras que crecen aeróbicamente en glucosa consume ATP	70
 2. Caracterización del transportador de ATP-Mg/Pi en cerebro e hígado, SCaMC-3	73
- 2.1) Expresión de SCaMC-3 en tejidos de ratón	73
- 2.2) SCaMC-3 es el transportador de ATP-Mg/Pi de hígado de ratón	74
- 2.3) El transportador de ATP-Mg/Pi SCaMC-3 modula la apertura del PTP en mitocondria de hígado y cerebro de ratón	75
- 2.4) El efecto de SCaMC-3 en el PTP se debe a la modificación del contenido neto de nucleótidos de adenina	79
 3. Caracterización del transportador de ATP-Mg/Pi en células, SCaMC-1	82
- 3.1) SCaMC-1 es el transportador de ATP-Mg/Pi presente en líneas celulares	82
- 3.2) Silenciamiento de SCaMC-1 en líneas celulares	82
- 3.3) Respiración y potencial de membrana mitocondrial en células intactas	83
- 3.4) Las mitocondrias de células Cos-7 muestran actividad del transportador de ATP-Mg/Pi	84
- 3.5) El transportador de ATP-Mg/Pi SCaMC-1 modula la capacidad de acumulación de calcio y la apertura del PTP en mitocondria de líneas celulares	87
- 3.6) SCaMC-1 interviene en el tamponamiento del calcio mitocondrial en mitocondria aislada	90
- 3.7) La homeostasis del calcio mitocondrial está afectada en células sin SCaMC-1	91
- 3.8) SCaMC-1 modula la apertura del PTP en células	92
 <b>Discusión</b>	<b>97</b>
1. Función de la SCaMC en levaduras.	99
- 1.1) Sal1p es el transportador de ATP-Mg/Pi en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99

- 1.2) Función fisiológica de Sal1p (1): señalización por calcio en células en ayuno	100
- 1.3) Función fisiológica de Sal1p (2): crecimiento exponencial en glucosa	102
2. Función de las SCaMCs en mamíferos.	105
- 2.1) SCaMC-1 y SCaMC-3 son los transportadores de ATP-Mg/Pi presentes, respectivamente, en líneas celulares y tejidos (cerebro e hígado)	105
- 2.2) Los transportadores de ATP-Mg/Pi son un nuevo mecanismo de regulación del PTP	106
- 2.3) Modelo de la regulación de la capacidad de tamponamiento de calcio de la mitocondria de mamífero	108
- 2.4) Papel de las SCaMCs en la muerte celular	110
<b>Conclusiones</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>117</b>
<b>Anexo</b>	<b>135</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Introducción

Figura 1.1. Estructura de los transportadores mitocondriales	4
Figura 1.2. Familia de los transportadores mitocondriales	6
Figura 1.3. Residuos conservados y simétricos en el transportador de ADP/ATP de mamíferos	7
Figura 1.4. Mecanismo de transporte en los transportadores mitocondriales	8
Figura 1.5. Estructura del sitio de unión al sustrato en los transportadores mitocondriales	9
Figura 1.6. Función del transportador de ADP/ATP	11
Figura 1.7. Función del transportador de ATP-Mg/Pi	13
Figura 1.8. Estructura de los CaMC	14
Figura 1.9. Lanzadera mitocondrial de NADH de malato/aspartato	15
Figura 1.10. Estructura de las SCaMCs en humanos y levadura	16
Figura 1.11. Esquema simplificado de la homeostasis del calcio en la célula de mamífero	17
Figura 1.12. Homeostasis del calcio en la mitocondria de mamífero	18
Figura 1.13. Componentes del PTP	22

### Materiales y métodos

Figura 3.1. Sistema para detectar los niveles de ATP mitocondrial basado en la enzima luciferasa dirigida a este orgánulo	32
Figura 3.2. Generación de los plásmidos de expresión de la luciferasa mitocondrial	34
Figura 3.3. Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de levadura	35
Figura 3.4. Calibración de la luciferasa recombinante	39
Figura 3.5. Generación y genotipado de animales deficientes en SCaMC-3	42
Figura 3.6. Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de hígado y cerebro de ratón	42
Figura 3.7. Captura y acumulación de calcio y apertura del PTP en mitocondrias	44
Figura 3.8. Eliminación de la expresión de SCaMC-1 mediante shRNA	46
Figura 3.9. Alineamiento del <i>RNA</i> mensajero de SCaMC-1 en ratón, rata y humanos	47
Figura 3.10. Esquema del funcionamiento del XF24	49
Figura 3.11. Generación del plásmido de expresión de la luciferasa mitocondrial	50
Figura 3.12. Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de células en cultivo	51

## Resultados

### Parte I

Figura 4.1. Alineamiento de las SCaMCs humanas y de levadura, calmodulina y el transportador de ADP/ATP.	56
Figura 4.2. El mutante <i>sal1Δ</i> carece de la expresión de Sal1p.	57
Figura 4.3. Expresión de la luciferasa	58
Figura 4.4. Localización de la luciferasa en la matriz mitocondrial	58
Figura 4.5. Calibración de la luciferasa recombinante	60
Figura 4.6. Niveles de ATP durante la fosforilación oxidativa	61
Figura 4.7. Sal1p transporta ATP y es activado por calcio	61
Figura 4.8. Constantes cinéticas de Sal1p	62
Figura 4.9. Efectos del $Mg^{2+}$ y Pi en el transporte de ATP a través de Sal1p	63
Figura 4.10. Sal1p también transporta ADP y es activado por calcio	64
Figura 4.11. Comparación del sitio de unión con el sustrato de los AAC y Sal1p	65
Figura 4.12. Transporte de ATP a través de los AACs y Sal1p	66
Figura 4.13. Diferencias en el comportamiento de células y mitocondrias permeabilizadas	68
Figura 4.14. Sal1p es una diana de las señales de calcio in vivo	69
Figura 4.15. Cinética de generación de yemas en levaduras después de un ayuno	70
Figura 4.16. ATP mitocondrial en células que crecen en etanol	71
Figura 4.17. ATP mitocondrial en células que crecen en glucosa	72

### Parte II

Figura 4.18. Expresión de las isoformas de las SCaMCs en tejidos de ratón	73
Figura 4.19. Transporte de ATP a través de SCaMC-3 y su dependencia de calcio	74
Figura 4.20. SCaMC-3 aumenta la CRC en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina en mitocondrias de hígado	76
Figura 4.21. SCaMC-3 aumenta la CRC en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina en mitocondrias de cerebro	76
Figura 4.22. Efectos de la presencia de CsA y CAT en la CRC de mitocondrias de hígado	77
Figura 4.23. SCaMC-3 protege a las mitocondrias de hígado del hinchamiento inducido por $Ca^{2+}$ en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina	78
Figura 4.24. SCaMC-3 protege en mitocondrias de cerebro del hinchamiento inducido por $Ca^{2+}$ en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina	79
Figura 4.25. La modificación del contenido de nucleótidos de adenina intramitocondrial altera la apertura del PTP	80

### Parte III

Figura 4.26. Expresión de las isoformas de las SCaMCs en líneas celulares y tejidos	82
Figura 4.27. Silenciamiento de SCaMC-1 en células Cos-7 y 143B mediante shRNA	83
Figura 4.28. Análisis de la respiración en células control y SCaMC-1 <i>knock-down</i> intactas	84
Figura 4.29. La luciferasa mitocondrial en células es capaz de detectar cambios en los niveles de ATP	85
Figura 4.30. Transporte de ATP insensible a CAT en mitocondrias de células Cos-7.	86
Figura 4.31. SCaMC-1 aumenta la CRC en mitocondrias de células Cos-7 en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina	87
Figura 4.32. Hinchamiento en mitocondrias control y SCaMC-1 knock-down de células Cos-7 después de la adición de $\text{Ca}^{2+}$	88
Figura 4.33. SCaMC-1 aumenta la CRC en mitocondrias de células 143B en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina	88
Figura 4.34. Hinchamiento en mitocondrias control y SCaMC-1 knock-down de células 143B después de la adición de $\text{Ca}^{2+}$	89
Figura 4.35. Comparación de la salida de $\text{Ca}^{2+}$ en mitocondrias de células 143B control y SCaMC-1 knock-down.	90
Figura 4.36. Medida de la concentración $\text{Ca}^{2+}$ en el citosol y mitocondria de células intactas en respuesta a la adición de agonistas	91
Figura 4.37. Efecto de SCaMC-1 en la muerte celular inducida por $\text{H}_2\text{O}_2$	92
Figura 4.38. Efecto de SCaMC-1 en la apertura del PTP inducida por láser en células Cos-7	94

### Discusión

Figura 5.1. Papel de Sal1p en la señalización por calcio inducida por glucosa en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
Figura 5.2. Las células de levadura necesitan ATP mitocondrial y $\Delta\Psi$ para sobrevivir	103
Figura 5.3. Interacción funcional entre los AAC, Sal1p y otros componentes mitocondriales para generar ATP mitocondrial y $\Delta\Psi$ en células de levadura control (en respiración o fermentación), sin ADN mitocondrial y sin AACs.	104
Figura 5.4. Los nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial protegen frente a la apertura del PTP	107
Figura 5.5. Modelo de la regulación de la capacidad de tamponamiento de calcio y la apertura del PTP	108
Figura 5.6. Modelo de los efectos de la conformación de ANT sobre el PTP	109





## ÍNDICE DE TABLAS

### Introducción

Tabla 1.1. Transportadores mitocondriales en humanos y levaduras	5
Tabla 1.2. Puntos de unión al sustrato en los MC de levadura	10
Tabla 1.3. Transportadores de ADP/ATP (ANT) en mamíferos	12
Tabla 1.4. Genes de las SCaMCs	15
Tabla 1.5. Reguladores del PTP	21
Tabla 1.6. Diferencias y semejanzas entre el PTP de mamíferos y el YMUC de levaduras	24

### Materiales y métodos

Tabla 3.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar la luciferasa y COX4	33
Tabla 3.3. Oligonucleótidos empleados para genotipar los ratones	41
Tabla 3.4. Oligonucleótidos utilizados para generar el vector pSuper.retro.neo+gfp-SCaMC-1	48
Tabla 3.5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar COX8	50



## ABREVIATURAS

$\alpha$ -KG	$\alpha$ -cetoglutarato
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana
$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradiente electroquímico de protones
$\Delta\text{pH}$	Gradiente de pH
$\rho^0$	Células sin <i>DNA</i> mitocondrial
AGC	Transportador de aspartato/glutamato
AMP/ADP/ATP	Adenosina 5' mono/di/trifosfato
AMPC	AMP cíclico
AAC	Transportador de ADP/ATP (levaduras)
<i>AdN</i>	Nucleótidos de adenina
ANT	Transportador de ADP/ATP (mamíferos)
$\text{As}_i$	Arsenato inorgánico
BKA	Ácido bongkreico
BSA	Albúmina de suero bovino
$\text{Ca}^{2+}$	Calcio
$[\text{Ca}^{2+}]_c$	Concentración de calcio libre citosólico
$[\text{Ca}^{2+}]_m$	Concentración de calcio libre mitocondrial
CaMC	Transportadores mitocondriales dependientes de calcio
CaU	Uniportador de calcio
CAT	Carboxiatractilósido
CoA	Coenzima A
CRC	Capacidad de captura de calcio
CsA	Ciclosporina A
CyP-D	Ciclofilina D
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>DNA</i> <sub>mit</sub>	<i>DNA</i> mitocondrial
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Acido etilenglicoltetraacético
FCCP	Carbonil cianuro p-(trifluorometoxi) fenilhidrazona
KD	<i>Knock-down</i>
kDa	KiloDalton
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
KO	<i>Knock-out</i>

KRB	Tampón Krebs-Ringer
IM	Tampón de aislamiento de mitocondrias de células
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
IP <sub>3</sub> R	Receptores de IP <sub>3</sub>
MC	Transportadores mitocondriales
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
MM	Médio mínimo de levaduras
MSK	Tampón de manitol/sacarosa/potasio
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/reducido
nm	Nanometro
ORF	Fase de lectura abierta
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pi	Fosfato inorgánico
PiC	Transportador mitocondrial de fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPi	Pirofosfato
PTP	Poro de transición de permeabilidad
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Rojo de rutenio
RyR	Receptores de rianodina
S <sub>0.5</sub>	Constante de semisaturación
SDS	Dodecilsulfato sódico
SCaMC	Transportadores mitocondriales con dominios de unión a calcio cortos
SEM	Error estándar de la media
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
shRNA	<u>s</u> mall <u>h</u> airpin <u>R</u> NA
SM	Medio mínimo sintético de levaduras
TE	Tampón de extracción de mitocondrias de tejidos de ratón
TMRM	Metiléster de tetrametilrodamina
V <sub>i</sub>	Vanadato inorgánico
WT	Salvaje ( <i>wild type</i> )
YNB	Base nitrogenada de levaduras

YPD	Medio rico de levaduras con glucosa
YPGR	Medio rico de levaduras con galactosa y rafinosa



## SUMMARY

The transport of metabolites across the inner mitochondrial membrane is carried out by a family of proteins called Mitochondrial Carriers (MC). Studies in our laboratory led to the identification of a novel subfamily of mitochondrial carriers, the SCaMCs (Short Calcium-binding Mitochondrial Carriers), with at least four paralogues in mammals (SCaMC-1/SLC25A24, SCaMC-2/SLC25A25, SCaMC-3/SLC25A23 and SCaMC-3like/SLC25A41) and only one in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (*SAL1*). Most SCaMCs are characterized by, in addition to the MC domain, an N-terminal domain which harbours calcium binding motifs that face the intermembrane space. Thus, the activity of these proteins could be regulated by extramitochondrial calcium.

SCaMCs correspond to isoforms of the ATP-Mg/Pi carrier, whose transport activity was functionally identified 20 years ago, and catalyze the net transport of adenine nucleotides across the inner mitochondrial membrane. They mediate a reversible electroneutral exchange between ATP-Mg<sup>2+</sup> and HP0<sub>4</sub><sup>2-</sup>. The ATP-Mg/Pi carrier regulates the matrix adenine nucleotide content, contributing to the regulation of mitochondrial activities dependent on adenine nucleotides such as gluconeogenesis, urea synthesis, mitochondrial biogenesis or permeability transition pore opening.

We have studied the transport activity, calcium regulation and function of the SCaMCs in three different models: yeast mitochondria, where Sal1p is the only SCaMC present; mouse liver and brain mitochondria, where SCaMC-3 is the main paralogue; and cell lines mitochondria, where SCaMC-1 is the main paralogue.

The yeast ATP-Mg/Pi carrier is activated by calcium with a  $S_{0.5}$  of 15.0  $\mu$ M, and is recruited as a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism to import ATP-Mg from the cytosol upon glucose addition to nutrient starved yeast, and is also involved in ATP-Mg uptake from the cytosol in yeast growing exponentially in glucose, a condition in which yeast mitochondria are ATP consumers.

SCaMC-1 and SCaMC-3 in mammals are activated by calcium with a  $S_{0.5}$  of 12.7 and 3.4  $\mu$ M, respectively. They are involved in the regulation of the calcium retention capacity, by regulating the matrix free calcium concentration, and thus they regulate the permeability transition pore (PTP), a non-specific pore that is formed in the inner mitochondrial membrane under conditions of calcium overload and/or oxidative stress, which has been implicated in cell death by necrosis, for example in situations of ischemia-reperfusion. These findings have led us to propose a new model for the regulation of the calcium retention capacity and PTP opening in mitochondria.





## Introducción

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. LA MITOCONDRIA.

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana presente en la mayoría de las células eucariotas que lleva a cabo funciones diversas como la respiración mitocondrial, síntesis de ATP por fosforilación oxidativa, ciclo de Krebs y  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.

En las células eucariotas el ATP es generado tanto en el citosol, por medio de la glucólisis, como en la mitocondria, por medio de la fosforilación oxidativa. Mientras que durante la glucólisis sólo se producen 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, mediante la fosforilación oxidativa, que requiere la presencia de oxígeno, se generan alrededor de 32 moléculas de ATP por molécula de glucosa. En este sentido, la mitocondria es considerada como la central energética de la célula.

La mitocondria también lleva a cabo otras funciones importantes: homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), producción de calor, regulación de la apoptosis y necrosis, metabolismo de aminoácidos y síntesis de centros de hierro y azufre.

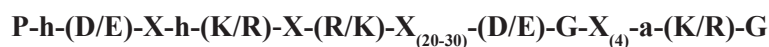
Sin embargo, muchos grupos de eucariotas unicelulares aparentemente carecen de mitocondrias, y contienen en su lugar orgánulos de doble membrana llamados hidrogenosomas o mitosomas (van der Giezen et al., 2002; Voncken et al., 2002; Chan et al., 2005). Se piensa que han evolucionado a partir de mitocondrias, con la pérdida consiguiente de características mitocondriales, incluido el genoma. Los hidrogenosomas producen ATP por oxidación del piruvato utilizando la enzima piruvato-ferredoxina oxidorreductasa y generando hidrogeno molecular como producto de desecho utilizando una hidrogenasa (Satrústegui et al., 2007). Los mitosomas, por el contrario, no tienen un papel obvio en la síntesis de ATP, ya que la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa y la hidrogenasa están localizadas en el citosol de los organismos que los contienen (Satrústegui et al., 2007).

### 2. TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES.

Mientras que la membrana mitocondrial externa de la mitocondria es bastante permeable a metabolitos debido a la presencia de proteínas transportadoras inespecíficas (porinas), la membrana mitocondrial interna es impermeable a moléculas grandes y moléculas cargadas. El transporte de metabolitos a través de la membrana mitocondrial interna, por tanto, es llevado a cabo por proteínas pertenecientes a la familia de los transportadores mitocondriales (familia SLC25; Palmieri, 2004; Kunji, 2004; del Arco y Satrústegui, 2005).

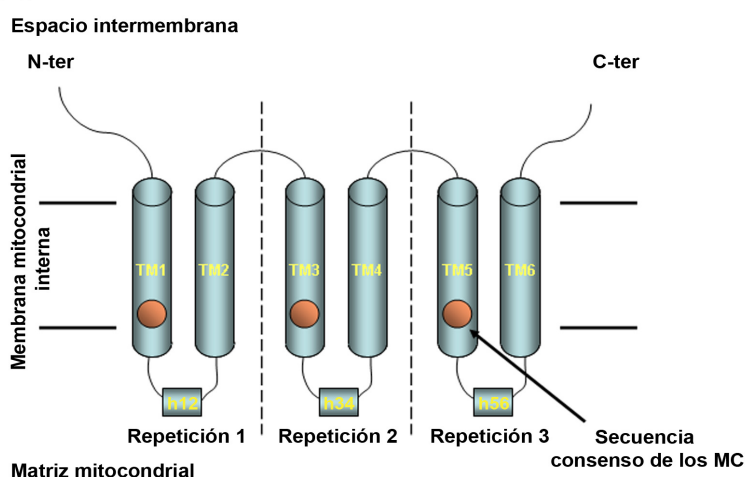
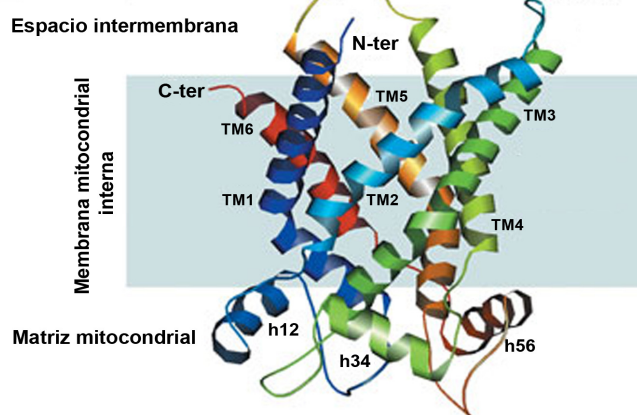
Todos los transportadores mitocondriales (MC: *Mitochondrial Carriers*) tienen una estructura similar (figura 1.1A). Su tamaño es de aproximadamente 30 kDa. Constan de 3 repeticiones de aproximadamente 100 aminoácidos. Cada repetición posee 2 hélices transmembrana unidas por un segmento dirigido hacia la matriz mitocondrial. Las repeticiones están unidas entre sí por un corto segmento dirigido hacia el espacio intermembrana. Las 3 repeticiones dan lugar, por tanto, a 6 hélices transmembrana. Los extremos amino y carboxilo terminales están orientados hacia el espacio

intermembrana. A pesar de que la similitud en secuencia entre las distintas proteínas de la familia no es muy alta, se ha determinado una secuencia conservada (Palmieri, 2004):



donde  $X$  es cualquier aminoácido,  $h$  es un aminoácido hidrofóbico y  $a$  un aminoácido aromático.

La estructura del transportador mitocondrial de ADP/ATP (AAC o ANT) unido a su inhibidor específico carboxiatractilósido (CAT) ha sido resuelta por cristalografía de rayos X (Pebay-Peyroula et al., 2003) y se ajusta muy bien al modelo que se había propuesto (figura 1.1B). Durante mucho tiempo se ha pensado que estos transportadores funcionaban como homodímeros, ya que numerosas pruebas bioquímicas así lo confirmaban (Hatanaka et al., 1999; Huang et al., 2001; Phelps y Wohlrab, 2004). Sin embargo, recientemente estudios del laboratorio de Kunji han puesto de manifiesto que la estructura más probable, y al menos la unidad funcional, es el monómero (Bamber et al., 2006, 2007a, 2007b).

**A****B**

**Figura 1.1. Estructura de los transportadores mitocondriales.**

**A)** Esquema de la estructura. Los MC constan de 3 repeticiones de 100 aminoácidos (separadas por líneas discontinuas). Cada repetición está compuesta de 2  $\alpha$ -hélices unidas por un segmento localizado en la matriz mitocondrial. En total hay 6 hélices transmembrana (denominadas desde TM1 hasta TM6). En las hélices impares se localiza la secuencia consenso de los MC (círculo naranja). **B)** Estructura real del transportador de ADP/ATP de mamíferos unido a su inhibidor CAT. Se ajusta perfectamente al modelo del panel A. Las hélices transmembrana están indicadas como TM1-TM6 y los segmentos dirigidos hacia la matriz mitocondrial forman pequeñas  $\alpha$ -hélices (denominadas h12, h34 y h56, según las hélices transmembrana que separan). La prolina inicial de la secuencia consenso introduce un acodamiento en las hélices impares. Modificado de Pebay-Peyroula et al., 2003.

Transportador en humano	Metabolito	Transportador en levadura	Referencia
SLC25A1 CIC	Citrato	YBR291c CTP1	Kaplan et al., 1993
SLC25A2 ORC-2 SLC25A15 ORC-1	Ornitina/Citrulina	YOR130c ORT1	Fiermonte et al., 2003
SLC25A3 PiC	Fosfato	YJR077c MIR1 YER053c PIC2	Runswick et al., 1987
SLC25A4 ANT1 SLC25A5 ANT2 SLC25A6 ANT3 SLC25A31 ANT4	ADP/ATP	YMR056c AAC1 YBL030c AAC2 YBR085w AAC3	Klingenberg, 2008 Dolce et al., 2005
SLC25A7 UCP1 SLC25A8 UCP2 SLC25A9 UCP3			Ledesma et al., 2002
SLC25A10 DIC	Dicarboxilatos	YLR348c DIC1	Fiermonte et al., 1999
SLC25A11 OGC	Oxoglutarato/Malato		Runswick et al., 1990
SLC25A12 AGC1 aralar SLC25A13 AGC2 citrina	Aspartato/Glutamato	YPR021c AGC1	Palmieri et al., 2001
SLC25A18 GC-2 SLC25A22 GC-1	Glutamato		Fiermonte et al., 2002
SLC25A14 UCP5 (BMCP1)			Sanchis et al., 1998
SLC25A16 GDC SLC25A42	Coenzima A	YHR002w LEU5	Fiermonte et al., 2009
SLC25A17 ANC	ATP/AMP peroxisomal	YPR128c ANT1	Visser et al., 2002
SLC25A19 DNC	Tiamina pirofosfato	YGR096w TPC1	Lindhurst et al., 2006
SLC25A20 CAC	Carnitina/Acil-carnitina	YOR100c CRC1	Huizing et al., 1997
SLC25A21 ODC	Oxodicarboxilatos	YPL134c ODC1 YOR222w ODC2	Fiermonte et al., 2001
SLC25A23 SCaMC-3 SLC25A24 SCaMC-1 SLC25A25 SCaMC-2 SLC25A41 SCaMC-3L	ATP-Mg/Pi	YNL083w SAL1	del Arco y Satrústegui, 2004 Fiermonte et al., 2004 del Arco, 2005 Traba et al., 2009a
SLC25A26 SAMC	S-adenosil-metionina	YNL003c SAM5	Agrimi et al., 2004
SLC25A27 UCP4			Mao et al., 1999
SLC25A28 hMRS3/4 SLC25A37 Mfm	Fe <sup>2+</sup>	YJL133w MRS3 YKR052c MRS4	Shaw et al., 2006
SLC25A29	Similar a Carnitina/Acil-carnitina	YPR058w YMC1 YBR104w YMC2	Sekoguchi et al., 2003
SLC25A30 KMCP1 (UCP?)			Haguenauer et al., 2005
SLC25A32 MFT	FAD NAD <sup>+</sup> NAD <sup>+</sup>	YIL134w FLX1 YEL006w NDT2 YIL006w NDT1	Spaan et al., 2005 Haitina et al., 2006
SLC25A33 PNC1 SLC25A36	UTP Nucleótidos de pirimidina	YBR192w RIM2	Haitina et al., 2006 Floyd et al., 2007
SLC25A34 SLC25A35	Oxaloacetato	YKL120w OAC1	Haitina et al., 2006
SLC25A38	¿Glicina?	YDL119c	Guernsey et al., 2009
SLC25A39 SLC25A40	¿Mn?	YGR257c MTM1	Haitina et al., 2006
SLC25A43		YPR011c	Haitina et al., 2006
SLC25A44	¿Glutamina?		Haitina et al., 2006
SLC25A45	Similar a Carnitina/Acil-carnitina		Haitina et al., 2006
SLC25A46	Similar a citrato		Haitina et al., 2006
Ausente		YMR166c	
Ausente	GDP/GTP	YDL198c GGC1	
Ausente	Succinato/Fumarato	YJR095w SFC1	
Ausente		YFR045w	
Ausente		YMR241w YHM2	

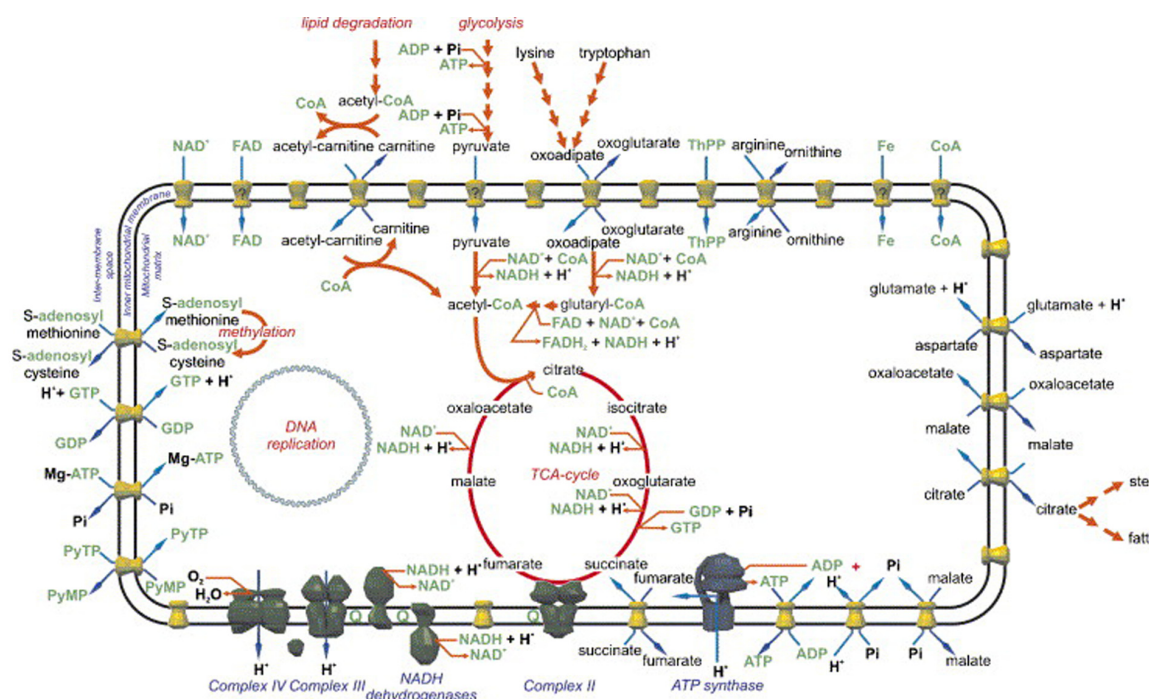
**Tabla 1.1. Transportadores mitocondriales en humanos y sus correspondientes ortólogos en levaduras.**

El genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* codifica para 34 MC. Se conoce el metabolito transportado por 27 de ellos. En humanos hay aproximadamente 50 MC (del Arco y Satrústegui, 2005). Los MC de humanos y levaduras y el metabolito que transportan se muestran en la tabla 1.1.

Los MC pueden ser electroneutros, como el transportador de ATP-Mg/Pi, o electrogénicos, como el transportador de ADP/ATP (Palmieri, 2004). La mayoría de los MC son intercambiadores estrictos, mientras que unos pocos pueden ser tanto intercambiadores como uniportadores, o incluso uniportadores estrictos, como el transportador de glutamato (Robinson et al., 2008). Basándonos en el tipo de metabolito que transportan, y en su semejanza, podemos clasificar los transportadores en:

- Transportadores de nucleótidos de adenina y derivados.
- Transportadores de aminoácidos.
- Transportadores de cetoácidos.

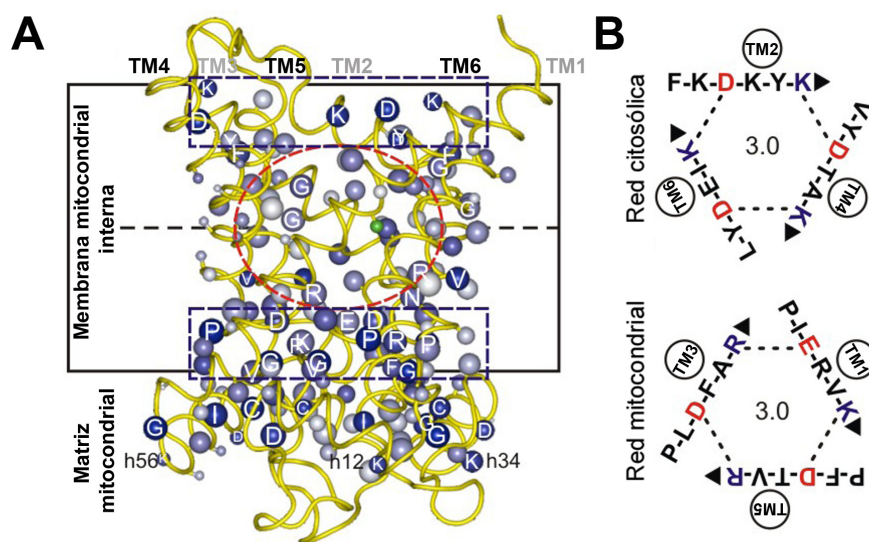
Los MC conocidos en levadura y su relación con el metabolismo mitocondrial se muestran en la figura 1.2.



**Figura 1.2. Familia de los transportadores mitocondriales.** Representación de la membrana mitocondrial interna en la que se muestran los complejos respiratorios, H<sup>+</sup>-ATP sintasa, transportadores mitocondriales y las rutas metabólicas en las que intervienen. Los transportadores desconocidos se marcan con un signo de interrogación. Tomado de Kunji y Robinson, 2006.

## 2.1) MECANISMO DE TRANSPORTE EN LOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES.

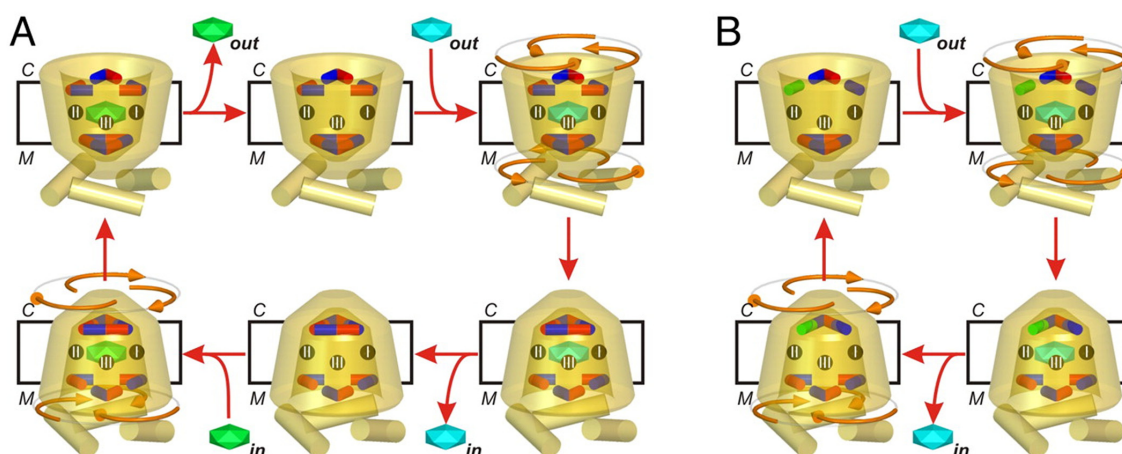
La estructura del transportador de ADP/ATP determinada por Pebay-Peyroula y colaboradores (Pebay-Peyroula et al., 2003), y estudios bioinformáticos de Kunji y colaboradores (Robinson et al., 2008) han permitido identificar el mecanismo de transporte de los MC. Hay dos grupos de residuos conservados y simétricos en todos los MC (figura 1.3). El primer grupo se encuentra en las hélices impares, cerca de la matriz mitocondrial, y consiste en el motivo P-X-(D/E)-X-X-(R/K) (parte de la secuencia consenso de los MC). Los residuos cargados de este motivo forman una red de puentes salinos que bloquean el acceso a la matriz cuando el transportador se encuentra en la conformación citoplasmática ("c"). El segundo grupo de residuos conservados se encuentra en las hélices pares, cerca del espacio intermembrana, y consiste en el motivo (F/Y)-(D/E)-X-X-(R/K). Los residuos cargados de este segundo motivo no tienen una función obvia en la conformación citoplasmática, pero se ha propuesto que también formarían una red de puentes salinos que bloquea el acceso al espacio intermembrana cuando el transportador se encuentra en la conformación mitocondrial ("m"). Los dos grupos de residuos han sido denominados red mitocondrial y citoplasmática respectivamente por Kunji (Robinson et al., 2008). La unión del sustrato al sitio de unión podría perturbar la red de puentes salinos y provocaría la apertura del transportador, y su conversión al otro estado (figura 1.4A).



**Figura 1.3. Residuos conservados y simétricos en el transportador de ADP/ATP de mamíferos.** **A)** El círculo rojo discontinuo muestra el lugar de unión del sustrato. Los rectángulos discontinuos muestran las redes citoplasmática y mitocondrial de puentes salinos. **B)** Red citoplasmática (en hélices pares, secuencia consenso (F/Y)-(D/E)-X-X-(R/K)) y red mitocondrial (en hélices impares, secuencia consenso P-X-(D/E)-X-X-(K/R)) de puentes salinos. Los residuos cargados negativamente y positivamente se muestran en rojo y azul respectivamente. Tomado de Robinson et al., 2008.



Este modelo de apertura del transportador ha permitido explicar por qué algunos transportadores funcionan como uniportadores, mientras que otros son intercambiadores estrictos. En algunos transportadores, como los de glutamato (SLC25A18 y SLC25A22), la red de puentes salinos citosólica no se ajusta a la secuencia consenso, de manera que no se forman puentes salinos. Esto permitiría la apertura del transportador incluso en ausencia de sustrato interno, y su conversión de nuevo al estado citosólico (figura 1.4B), es decir, un comportamiento de tipo uniportador (Robinson et al., 2008).



**Figura 1.4. Mecanismo de transporte en los transportadores mitocondriales.** C y M representan la cara citosólica y mitocondrial del transportador respectivamente. Los puntos de unión al sustrato I, II y III están representados como esferas negras en el centro del transportador. Los residuos cargados negativamente y positivamente de las redes de puentes salinos se muestran como barras rojas y azules respectivamente. **A)** Intercambiadores: el transportador en conformación “c” (citosólica) libera el sustrato saliente (objeto verde) al espacio intermembrana. En este momento la red mitocondrial está cerrada y la red citosólica está abierta. El sustrato entrante (objeto azul) se une al transportador y distorsiona la red de puentes salinos mitocondrial, lo que provoca el cambio a la conformación “m” (mitocondrial). El sustrato es liberado a la matriz. En este momento la red citosólica está cerrada y la red mitocondrial está abierta. El sustrato saliente se une al transportador y distorsiona la red de puentes salinos citosólica, lo que provoca el cambio a la conformación “c” y se cierra el ciclo. **B)** Uniportadores: el sustrato entrante (objeto azul) se une al transportador en conformación “c” y distorsiona la red de puentes salinos mitocondrial, lo que provoca el cambio a la conformación “m”. La red de puentes salinos citosólica no se ajusta a la secuencia consenso (barra verde), y no se forman puentes salinos, por lo que es inestable, de manera que el transportador vuelve a la conformación “c” sin necesidad de la unión a un sustrato saliente. Tomado de Robinson et al., 2008.

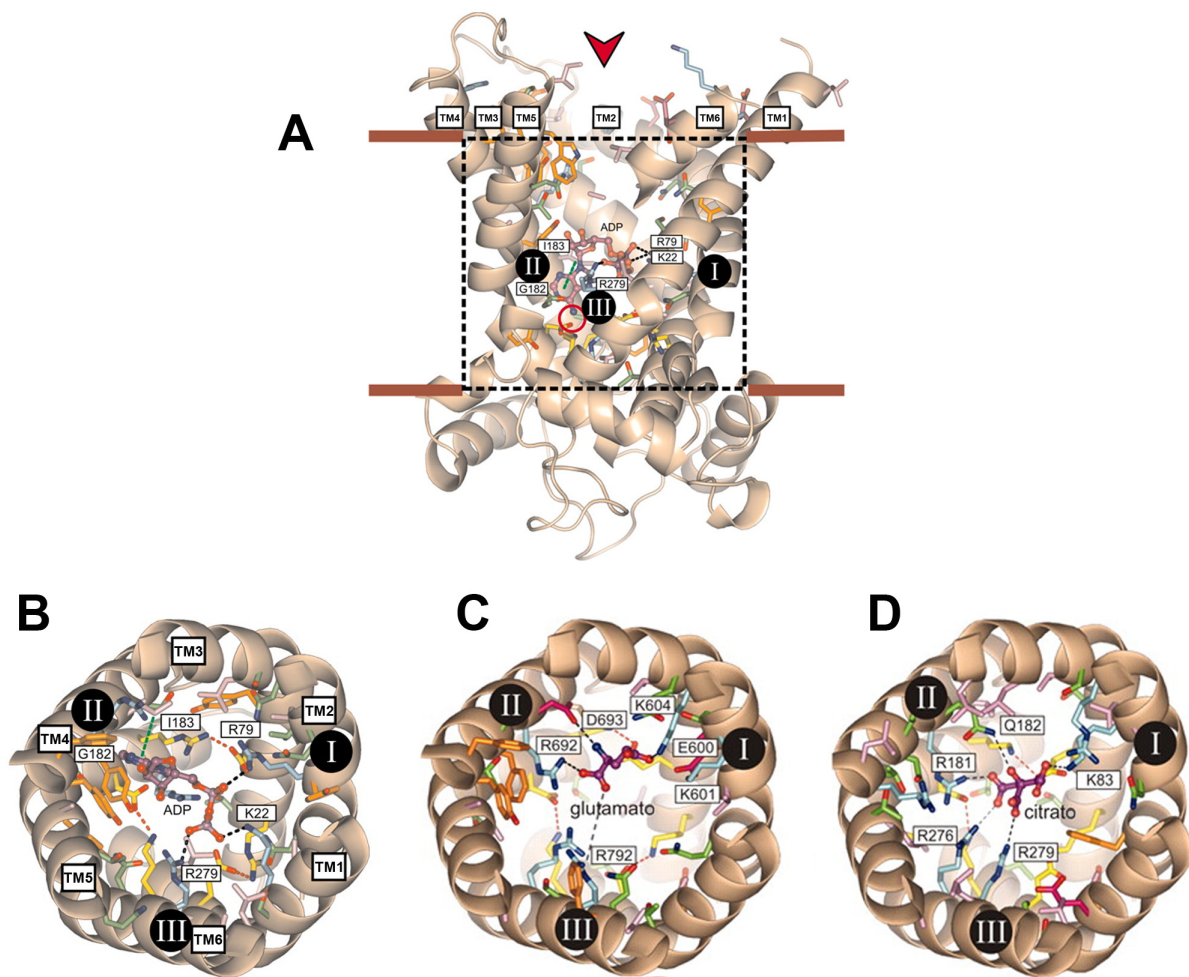
Los estudios de Kunji y Robinson han permitido también determinar la estructura del sitio de unión al sustrato en todos los MC (Robinson y Kunji, 2006; Kunji y Robinson, 2006; Robinson et al., 2008). Para ello se han basado en la estructura del transportador de ADP/ATP unido a CAT (Pebay-Peyroula et al., 2003; Wang y Tajkhorshid, 2008). El sustrato se une al transportador mitocondrial en 3 puntos de unión denominados I, II y III, situados en puntos equivalentes de las hélices transmembrana 2, 4 y 6 respectivamente (figura 1.5 y tabla 1.2). Estos puntos de unión están muy conservados en proteínas ortólogas de diferentes organismos.



a) El punto de contacto II discrimina entre distintos tipos de sustratos. Así, todos los transportadores de aminoácidos contienen el motivo R-[DE], los transportadores de nucleótidos contienen el motivo G-[IVLM], y los transportadores de cetoácidos contienen el motivo R-[QHNT].

b) El punto de contacto I discrimina entre diferentes sustratos del mismo tipo. Por ejemplo, los grupos carboxilo o fosfato se unen a [RK], los grupos amino se unen a [DE], los anillos aromáticos interaccionan con [FY] y los grupos hidrofóbicos se unen por interacciones de van der Waals a [ILV].

c) El punto de contacto III suele ser [RK] y se une a grupos fosfato (en los nucleótidos) o carboxilo (en aminoácidos y cetoácidos).



**Figura 1.5. Estructura del sitio de unión al sustrato en los transportadores mitocondriales.** El sustrato se une al transportador en 3 puntos de unión (I, II y III), situados en las hélices transmembrana 2, 4 y 6 (TM2, TM4 y TM6). El modelo muestra el transportador de ADP/ATP unido a ADP (A vista lateral, B vista desde el espacio intermembrana) como modelo de transportador de nucleótidos, el transportador de aspartato/glutamato unido a glutamato (C vista desde el espacio intermembrana) como modelo de transportador de aminoácidos y el transportador de citrato unido a citrato (D vista desde el espacio intermembrana) como modelo de transportador de cetoácidos. Modificado de Robinson y Kunji, 2006.

Transportador	Sustrato	Grupo		Punto de contacto		
		variable	común	I	II	III
Nucleótidos			adenina		G-[IVML]	[RK]
Aac1/2/3p	ADP	fosfato	adenina	R-T-N	G-I	R
Sal1p	ATP-Mg	fosfato-Mg <sup>2+</sup>	adenina	K-E-K	G-I	K
Leu5p	CoA	fosfato/amida	adenina	R-Y-K	G-M	K
Ypr011c	desconocido			R-Y-Q	G-V	K
Flx1p	FAD	flavina	adenina	G-A-Y	G-V	R
Rim2p	nc de pirimidina			G-A-N	G-S	R
Ndt1p	NAD <sup>+</sup>	nicotinamida	adenina	G-T-Y	G-L	R
Ndt2p	NAD <sup>+</sup>	nicotinamida	adenina	G-T-Y	G-M	R
Aminoácidos			aminoácido		R-[DE]	[RK]
Agc1p	glutamato	carboxilato	aminoácido	G-E-K	R-D	R
Crc1p	acetilcarnitina	metil éster	aminoácido	G-I-S	R-D	R
Pet8p	S-adenosil metionina	adenina	aminoácido	A-G-F	R-E	W
Ort1p	ornitina	amino	aminoácido	G-E-L	R-E	R
Ymc1p	desconocido			G-C-Q	R-E	R
Ymc2p	desconocido			G-C-Q	R-A	R
Ydl119c	¿glicina?	hidrogeno	aminoácido	R-G-Y	R-D	R
Ymr166c	desconocido			G-S-F	R-D	W
Mtm1p	¿Mn?			M-A-Y	R-D	K
Cetoácidos			cetoácido o ácido		R-[QHNT]	[RK]
Oac1p	oxaloacetato	carboxilato	cetoácido	Y-L-R	R-T	R
Dic1p	Malato	carboxilato	hidroxiácido	R-Y-R	R-G	R
Odc1p	2-oxoglutarato	carboxilato	cetoácido	M-K-K	R-H	R
Odc2p	2-oxoglutarato	carboxilato	cetoácido	M-K-K	R-N	R
Sfc1p	succinato	carboxilato	carboxilato	G-K-R	R-Q	R
Ctp1p	citrato/malato	carboxilato	hidroxiácido	G-K-R	R-Q	R
Yhm2p	desconocido			I-T-V	R-Q	L
Yfr045w	desconocido			A-K-R	R-Q	K
Otros						
Pic2p	fosfato			G-Q-K	R-Q	M
Mir1p	fosfato			G-Q-K	K-Q	M
Mrs3/4p	Fe <sup>2+</sup>			G-A-Y	M-N	A

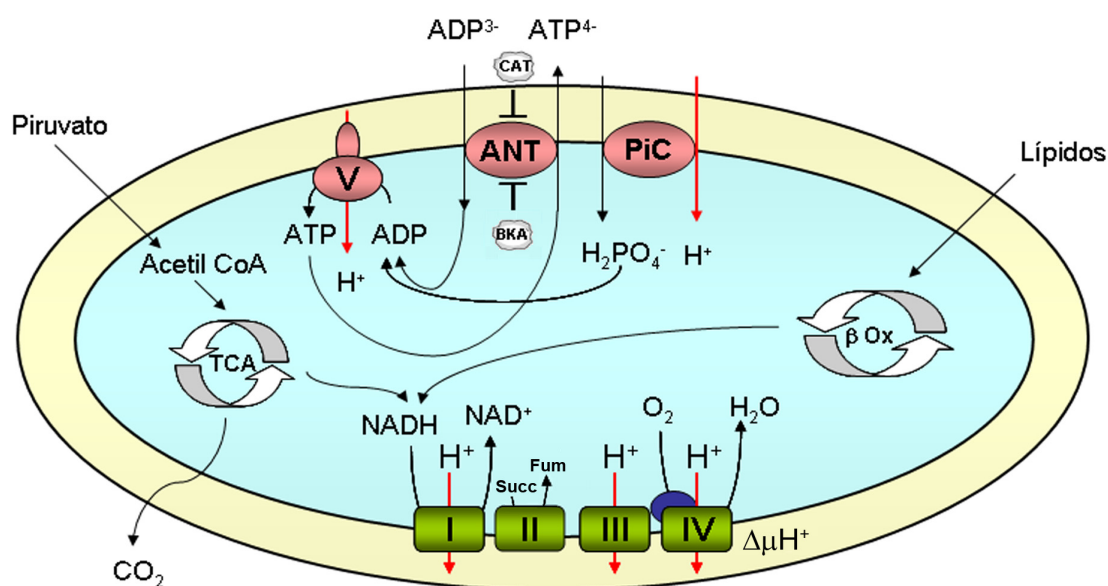
**Tabla 1.2. Puntos de unión al sustrato en los MC de levadura.** Se muestran los puntos de contacto I, II y III de cada transportador. El punto II interacciona con el grupo común de los sustratos, mientras que el punto I interacciona con el grupo variable. Los residuos subrayados interaccionan directamente con el sustrato. Modificado de Robinson y Kunji, 2006.

## 2.2) TRANSPORTADORES DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA EN LA MITOCONDRIA.

### 2.2.1. Transportadores de ADP/ATP:

El transportador mitocondrial de ADP/ATP (ANT o AAC) realiza un intercambio electrogénico de ADP<sup>3-</sup> por ATP<sup>4-</sup> entre el citosol y la mitocondria (Klingenberg, 2008). Es esencial para la fosforilación oxidativa, como muestra la figura 1.6, ya que en mitocondrias energizadas por respiración exporta el ATP generado en la mitocondria en intercambio por ADP citosólico. Una característica importante de

este transportador es que no es capaz de modificar el contenido neto de nucleótidos de adenina en la mitocondria ( $ATP + ADP + AMP$ ), ya que intercambia siempre un nucleótido por otro (Klingenberg, 2008).



**Figura 1.6. Función del transportador de ADP/ATP.** Representación esquemática del proceso de fosforilación oxidativa en la mitocondria. El NADH generado en la oxidación de lípidos ( $\beta$  Ox), en el ciclo de Krebs (TCA) y en otras reacciones, y el succinato (Succ) generado en el TCA son oxidados por los complejos de la cadena respiratoria (complejos I, II, III y IV en verde, citocromo C en azul) y se produce el bombeo de protones al espacio intermembrana. El gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu H^+$ ) es utilizado por la  $H^+$ -ATP sintasa (complejo V) para generar ATP a partir de ADP y Pi. El fosfato entra en la matriz mitocondrial acompañado de un protón a partir de su propio transportador (PiC, SLC25A3). El ATP generado es transportado al citosol a través del transportador de ADP/ATP (ANT) en intercambio con ADP citosólico. El transportador de ADP/ATP puede ser inhibido por CAT y BKA, que actúan desde lados opuestos de la membrana.

Se conocen varios inhibidores del transportador de ADP/ATP. El CAT se une al transportador en su cara citoplasmática y lo fija en la conformación “c”. En cambio, el ácido bongkreico (BKA) se une al transportador en su cara mitocondrial y lo fija en la conformación “m” (Klingenberg, 2008).

#### A) ANTs en mamíferos:

El genoma de mamíferos contiene 4 genes que codifican para ANTs (del Arco y Satrústegui, 2005): ANT1 (SLC25A4), ANT2 (SLC25A5), ANT3 (SLC25A6) y ANT4 (SLC25A31). En roedores sólo hay 3 genes, ya que ANT3 se ha perdido.

La tabla 1.3 resume la expresión de estos genes, enfermedades asociadas con ellos y el fenotipo de los ratones *knock-out* cuando existen.

Gen	Expresión en humanos (Stepien et al., 1992)	Expresión en roedores (Graham et al., 1997)	Fenotipo del ratón KO	Enfermedades
ANT1	Músculo esquelético y corazón	Músculo esquelético y corazón	Miopatía y cardiomiopatía mitocondrial (Graham et al., 1997)	Mutaciones de ganancia de función causan oftalmoplejia externa progresiva. Mutaciones de pérdida de función causan miopatía y cardiomiopatía (Palmieri et al., 2008)
ANT2	Células en proliferación	Ubicuo	-----	Sobreexpresada en tumores y células con daños en el <i>DNA</i> mitocondrial (Giraud et al., 1998; Bonod-Bidaud et al., 2002; Chevrollier et al., 2005)
ANT3	Ubicuo	Ausente	-----	-----
ANT4	Testículo	Testículo	Macho estéril. Reducción en el tamaño testicular (Brower et al., 2007)	-----

**Tabla 1.3. Transportadores de ADP/ATP (ANT) en mamíferos.**

#### B) AACs en levadura:

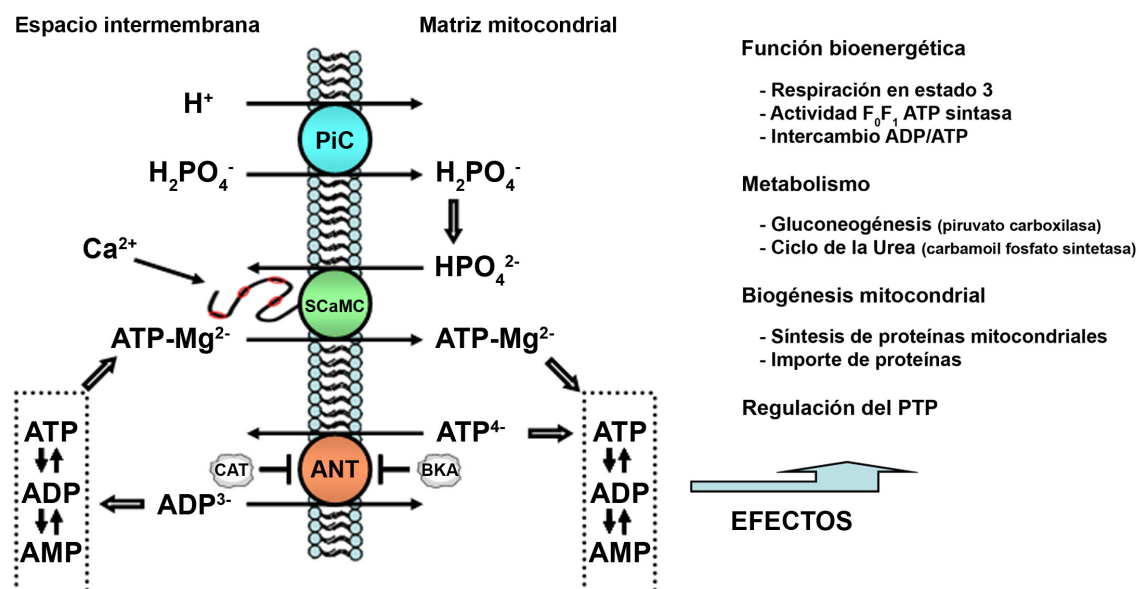
El genoma de *S. cerevisiae* contiene 3 genes (del Arco y Satrústegui, 2005): *AAC1*, *AAC2* y *AAC3*. La eliminación de *AAC1* y *AAC3*, individualmente o combinadas no produce ningún efecto en el crecimiento de la levadura (Drgon et al., 1991). Sin embargo, la eliminación de *AAC2*, que codifica para el AAC más importante, y el único cuya expresión puede detectarse por western blot, provoca la falta de crecimiento de la levadura en fuentes de carbono no fermentables (Lawson y Douglas, 1988). La eliminación conjunta de los 3 genes ha demostrado que este transportador sólo es esencial para el crecimiento anaeróbico de la levadura (Drgon et al., 1991), lo que sugiere que debe existir algún otro mecanismo capaz de transportar nucleótidos de adenina a través de las membranas mitocondriales, permitiendo el crecimiento de la levadura en fuentes de carbono fermentables y en condiciones aeróbicas.

#### 2.2.2. Transportadores de ATP-Mg/Pi:

El transportador de ATP-Mg/Pi fue descubierto por el grupo de Aprille a principios de los años 80 (Aprille y Austin, 1981). Descubrieron en mitocondrias de hígado de rata una actividad transportadora de nucleótidos de adenina que era estimulable por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial (Nosek et al., 1990). Intercambia de manera electroneutra  $\text{ATP-Mg}^{2-}$  con  $\text{HPO}_4^{2-}$  o  $\text{HADP}^{2-}$  con  $\text{HPO}_4^{2-}$  entre el citosol y la matriz mitocondrial (figura 1.7), y por tanto, es capaz de modular el contenido neto de nucleótidos de adenina ( $\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}$ ). Es insensible a los inhibidores del transportador de ADP/ATP (Aprille, 1988, 1993). La identidad molecular de este transportador ha sido identificada sólo muy recientemente (ver apartado 2.3; del Arco y Satrústegui, 2004; Fiermonte et al., 2004).

La regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  sugiere que este transportador se activa por hormonas que movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, como glucagón o vasopresina (Aprille, 1988, 1993). El transportador de ATP-Mg/Pi, al modificar el contenido neto de nucleótidos de adenina en la mitocondria, juega un papel importante en la regulación de procesos metabólicos mitocondriales que tienen reacciones dependiente de nucleótidos de adenina (figura 1.7). Esto incluye respiración en estado 3, gluconeogénesis (piruvato

carboxilasa), ciclo de la urea (síntesis de citrulina), síntesis de proteínas mitocondriales e importe de proteínas mitocondriales codificadas por el genoma nuclear (Aprille, 1988; 1993).



**Figura 1.7. Función del transportador de ATP-Mg/Pi.** El transportador de ATP-Mg/Pi (SCaMC) intercambia ATP-Mg por Pi (en forma  $HPO_4^{2-}$ ) entre el citosol y la mitocondria. La cadena de transporte electrónico genera un  $\Delta pH$ , que a su vez genera un gradiente de Pi a través del transportador de Pi (PiC). Este gradiente permite la entrada de ATP-Mg a la mitocondria, incluso contra gradiente de concentración, siempre que se active el transportador por medio de una señal de  $Ca^{2+}$  en el espacio intermembrana. El transportador de ATP-Mg/Pi contribuye a modificar el contenido neto de nucleótidos de adenina (ATP + ADP + AMP, cuadrado discontinuo). El transportador de ADP/ATP (ANT), por el contrario no modifica el contenido neto, pues siempre intercambia un nucleótido por otro. Los cambios en el contenido neto de nucleótidos de adenina podrían afectar a las reacciones que se muestran a la derecha en la figura. Modificado de Aprille, 1993.

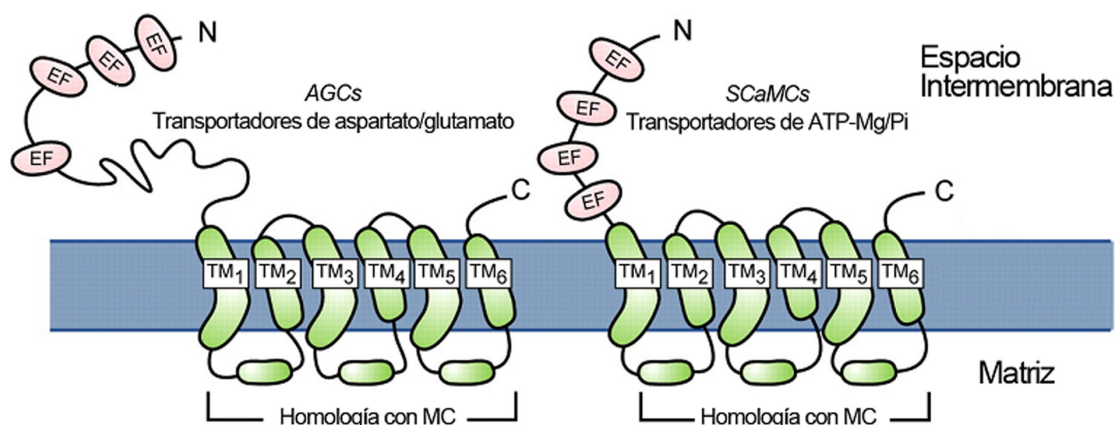
El transportador de ATP-Mg/Pi parece ser importante para la maduración mitocondrial tras el nacimiento. De hecho, el contenido neto de nucleótidos de adenina aumenta varias veces en mitocondrias de hígado de ratas neonatas en las 3 primeras horas tras el nacimiento, y ese aumento coincide con la maduración de la respiración mitocondrial (Aprille y Asimakis, 1980). Por otro lado, el contenido de nucleótidos de adenina también aumenta en mitocondrias de hígado de ratas adultas después de ayuno o tratamiento con glucagón (Wojtczak y Davis-van Thienen, 1987) y disminuye después de episodios de hipoxia e isquemia (Nakazawa y Nunokawa, 1977), o durante la hibernación (Gehrich y Aprille, 1988).

### 2.3) TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES DEPENDIENTES DE CALCIO.

Estudios previos de nuestro laboratorio han permitido identificar dos subgrupos de MC que poseen una extensión amino terminal que contiene dominios de unión a  $Ca^{2+}$  de tipo *EF-hand* orientados hacia el espacio intermembrana (Satrústegui et al., 2007). Fueron denominados CaMC (*Calcium-binding Mitochondrial Carriers*). Estos transportadores poseen, por tanto, una estructura



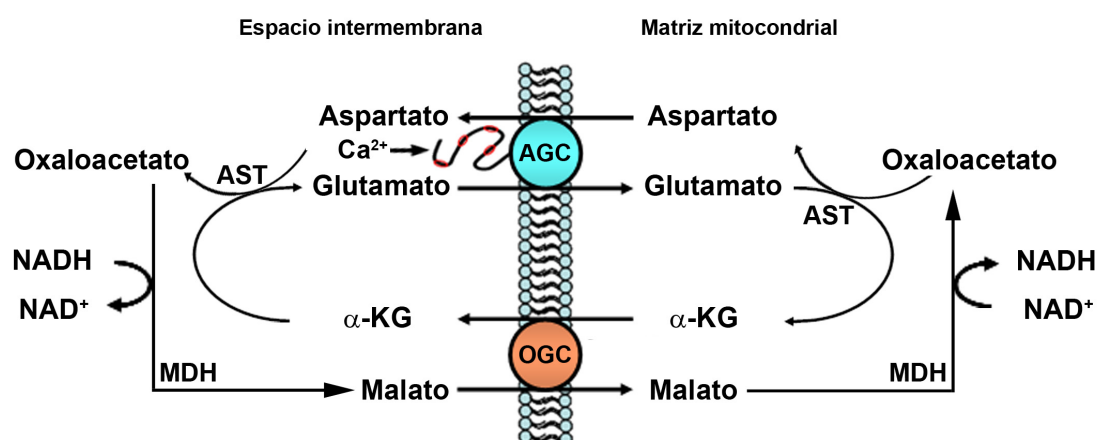
bipartita, con un extremo carboxilo terminal que presenta las características propias de los MC y un extremo amino terminal con dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 1.8). La presencia de estos dominios sugiere que la actividad transportadora de estos transportadores podría ser regulada por  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 1.8. Estructura de los CaMC.** Estos transportadores constan de dos dominios. El extremo C-terminal es similar al del resto de los MC, con 6 dominios transmembrana. El extremo N-terminal contiene motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo EF-hand. Podemos clasificar a los CaMC en AGCs (transportadores de aspartato/glutamato), con un dominio N-terminal de mayor extensión, y SCaMCs (transportadores de ATP-Mg/Pi), con un dominio N-terminal más corto y semejante a la calmodulina. Tomado de Satrustegui et al., 2007.

Estos transportadores se pueden clasificar en dos subgrupos. Inicialmente fueron clasificados en función de la longitud del extremo amino terminal (del Arco et al., 2000; figura 1.8). Un subgrupo posee un dominio amino terminal largo de unos 400 aminoácidos (LCaMCs: *long* CaMCs), mientras que el otro posee un dominio más corto, de unos 180 aminoácidos y muy similar en secuencia a la proteína calmodulina (SCaMC: *short* CaMCs). Los LCaMCs fueron identificados como transportadores de aspartato/glutamato (Palmieri et al., 2001), y renombrados, por tanto, como AGCs (*aspartate/glutamate Carriers*). Intervienen en la lanzadera de NADH de malato/aspartato (figura 1.9). En humanos hay dos isoformas, denominadas aralar (o AGC1, SLC25A12; del Arco y Satrustegui, 1998) y citrina (o AGC2, SLC25A13; del Arco et al., 2000; Kobayashi et al., 1999). Aralar es la isoforma presente en tejidos excitables, como cerebro y músculo (del Arco y Satrustegui, 1998), mientras que citrina está presente en tejidos no excitables, como el hígado (del Arco et al., 2000). Ambas están presentes en corazón (Contreras et al., 2007). Citrina está implicado en el ciclo de la urea en hígado y algunas mutaciones en humanos producen la enfermedad denominada citrulinemia de tipo II (Kobayashi et al., 1999), aunque el ratón KO no presenta la enfermedad (Sinasc et al., 2004). El ratón KO de *Aralar* presenta un retraso en el crecimiento, temblores, desmielinización en el sistema nervioso central y muerte a los 21 días después del nacimiento (Jalil et al., 2005). Recientemente se ha identificado un paciente con una mutación en *Aralar* (Wibom et al.,

2009). Dicho paciente muestra un fenotipo similar al del ratón deficiente en *Aralar*, concretamente hipomielinización en el cerebro.



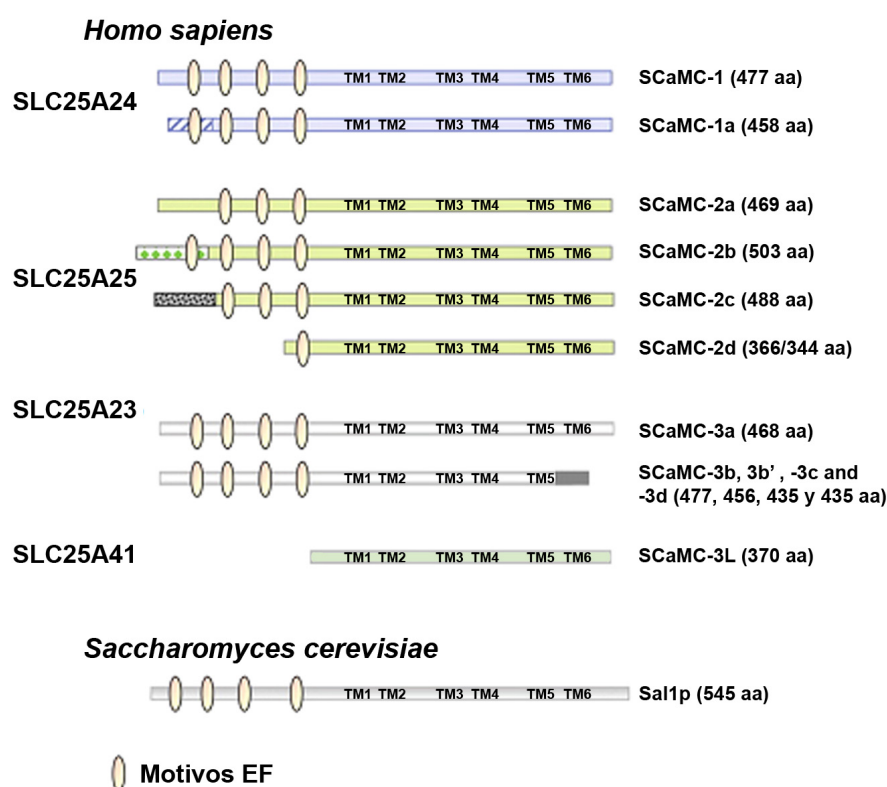
**Figura 1.9. Lanzadera mitocondrial de NADH de malato/aspartato.** El NADH generado en la glucólisis debe ser reoxidado para que la ruta pueda continuar funcionando. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH. La lanzadera transmite NADH desde el citosol a la matriz mitocondrial. Consta de dos transportadores mitocondriales (AGC: transportador de aspartato/glutamato; y OGC: transportador de oxoglutarato/malato) y dos enzimas localizadas tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial (malato deshidrogenasa, MDH; y aspartato transaminasa, AST). El AGC es activado por  $\text{Ca}^{2+}$  en el espacio intermembrana, y determina la velocidad de la vía.  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetoglutarato.

Las SCaMCs fueron identificadas como transportadores de ATP-Mg/Pi. En humanos existen 4 parálogos, SCaMC-1 (SLC25A24), SCaMC-2 (SLC25A25), SCaMC-3 (SLC25A23) (del Arco y Satrústegui, 2004; Fiermonte et al., 2004) y SCaMC-3like (SLC25A41) (Traba et al., 2009a). En mamíferos no primates existe un quinto parálogo, SCaMC-1like. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* sólo hay un gen, *SALI* (*YNL083w*) (Chen, 2004; Cavero et al., 2005). Las características de los genes de las SCaMCs se detallan en la tabla 1.4.

	Transportador	Cromosoma	Exones	Tamaño del gen	Tamaño de los transcritos	Acc No. de las isoformas
<b>Humanos</b>						
<i>SCaMC-1</i>	SLC25A24	1p13.3	10	65 kb	3.4 kb	1 AJ619987 1a AJ619961
<i>SCaMC-2</i>	SLC25A25	9q34.13	10	18 kb	3.4 kb (SCaMC-2a,-2b) 3.6 kb (SCaMC-2c)	2a AJ619989 2b AJ619990 2c AJ619991 2d AJ619992
<i>SCaMC-3</i>	SLC25A23	19q13.3	10	24 kb	3.4 kb	3a AJ619988 3b AJ879080 3b' AJ879081 3c AJ879082 3d AJ879083
<i>SCaMC-3L</i>	SLC25A41	19q13.3	7	8 kb	1.2 kb	NP_775908
<b>Levadura</b>						
	<b>ORF</b>					
<i>SALI</i>	<i>YNL083w</i>	XIV	1	1.6 kb	1.6 kb	AF419344

**Tabla 1.4. Genes de las SCaMCs.**

La subfamilia SCaMC es el grupo de MC más complejo en cuanto a número de parálogos e isoformas. Los genes SCaMC-1 y SCaMC-2 presentan diferentes isoformas generadas por promotores alternativos, de manera que difieren en su primer exón (del Arco y Satrústegui, 2004; Satrústegui et al., 2007). SCaMC-3 presenta varias isoformas generadas por *splicing* alternativo que difieren en su extremo carboxilo terminal (del Arco, 2005). Sólo la isoforma SCaMC-3a posee las 6 hélices transmembrana, mientras que las demás están truncadas y carecen de la sexta hélice. SCaMC-3like carece de dominio N-terminal con motivos EF, por lo que su actividad no está regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Haitina et al, 2006; Traba et al., 2009a). La figura 1.10 muestra un esquema de las distintas isoformas de SCaMCs.



**Figura 1.10. Estructura de las SCaMCs en humanos y levadura.** En humanos encontramos 4 genes, SLC25A24 (SCaMC-1), SLC25A25 (SCaMC-2), SLC25A23 (SCaMC-3) y SLC25A41 (SCaMC-3L). SCaMC-1 y SCaMC-2 generan varias isoformas que difieren en el primer exón gracias al uso de promotores alternativos. SCaMC-3 genera varias isoformas por *splicing* alternativo (en el extremo 3' del mensajero) que difieren en el extremo C-terminal. Las isoformas SCaMC-3b, -b', -c y -d están truncadas y carecen de la última hélice transmembrana (TM6). SCaMC-3L sólo genera una isoforma, que carece de dominio N-terminal con motivos EF, y por tanto es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En levaduras sólo hay una proteína, Sal1p. Tomado de Satrústegui et al., 2007.

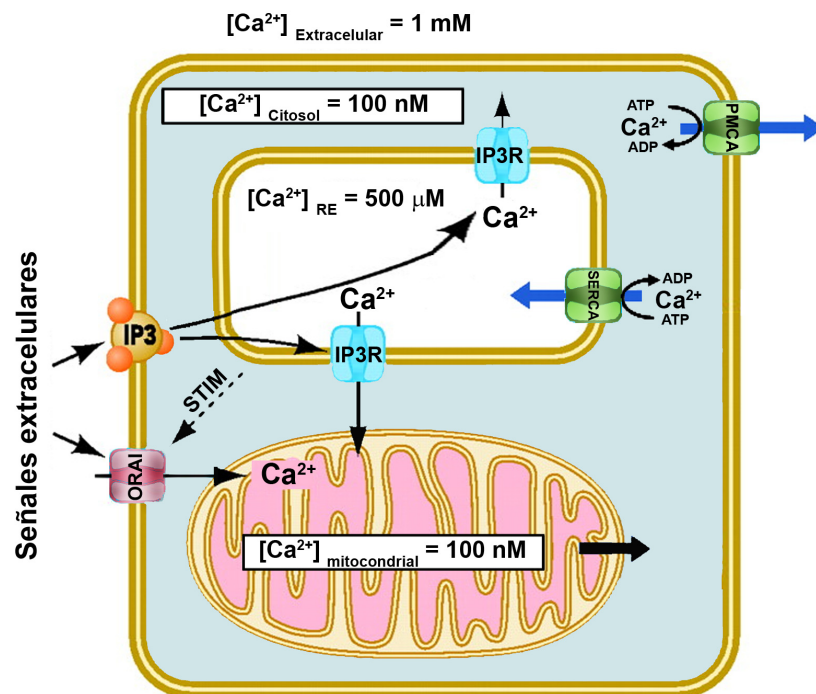
### 3. EL CALCIO COMO SEGUNDO MENSAJERO EN LA MITOCONDRIA.

El  $\text{Ca}^{2+}$  es un catión que se encuentra a una concentración muy baja en el interior de las células (Gunter y Pfeiffer 1990), y esto se consigue por medio de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 1.11), que expulsan el  $\text{Ca}^{2+}$  al medio extracelular (bombas PMCA: *plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases*) o a compartimentos celulares concretos, como el retículo endoplasmático (bombas SERCA: *sarco-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases*). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol o en la matriz mitocondrial es



aproximadamente 100-200 nM, mientras que en el medio extracelular y el retículo endoplasmático la concentración es mucho mayor (300-500  $\mu\text{M}$  en el retículo). Este enorme gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el citosol y el medio extracelular o depósitos internos permite que el  $\text{Ca}^{2+}$  actúe como segundo mensajero (Gunter y Pfeiffer 1990; Carafoli, 2002).

La llegada de una señal externa o interna a la célula, como hormonas, agonistas o una despolarización, provoca la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior (Gunter y Pfeiffer 1990), así como la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de los depósitos intracelulares (figura 1.11). El retículo endoplasmático posee dos tipos de receptores, los receptores de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) y los receptores de rianodina ( $\text{RyR}$ ). El vaciado del retículo endoplasmático estimula a su vez la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula desde el medio extracelular, por medio del sistema STIM/Orai (Cahalan, 2009). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  es normalmente transitorio, ya que las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  rápidamente devuelven rápidamente la concentración del ion a su estado basal (Carafoli, 2002).



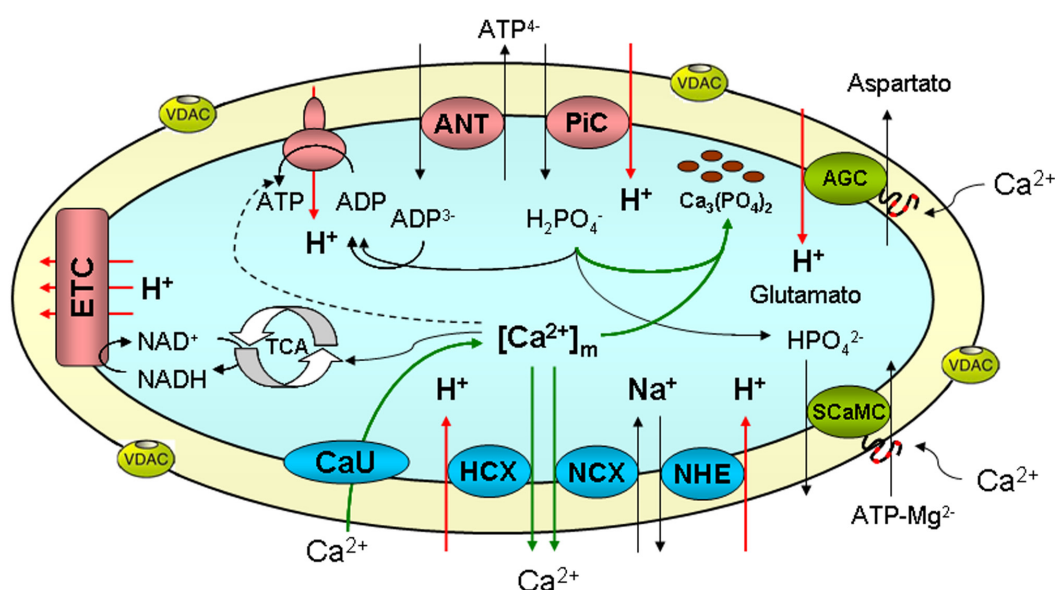
**Figura 1.11. Esquema simplificado de la homeostasis del calcio en la célula de mamífero.** El  $\text{Ca}^{2+}$  en el estado basal se encuentra a muy bajas concentraciones en el citosol y la mitocondria (100 nM). La llegada de una señal a la célula provoca la generación de inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El  $\text{IP}_3$  se une a sus receptores en el retículo endoplasmático ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), que a su vez son canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  se libera al citosol y parte entra en la mitocondria. El vaciado del retículo estimula la interacción de la proteína STIM del retículo con los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (ORAI) y provoca su apertura. Finalmente las bombas de membrana plasmática (PMCA) y de retículo (SERCA) devuelven el  $\text{Ca}^{2+}$  a sus niveles basales. No se muestran en la figura los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  regulados por voltaje de la membrana plasmática. Modificado de Szabadkai y Duchon, 2008.

Se conoce desde hace tiempo que variaciones en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulan funciones celulares clave, como la contracción de los miofilamentos, secreción de hormonas y neurotransmisores, regulación de la expresión génica y modulación del metabolismo (Carafoli, 2002, 2003). En la mitocondria el  $\text{Ca}^{2+}$  estimula las 3 deshidrogenasas mitocondriales (Nichols et al., 1994): piruvato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. El  $\text{Ca}^{2+}$  estimula, por tanto, el ciclo de Krebs y la consiguiente generación de NADH mitocondrial, lo cual

lleva finalmente a una mayor producción de ATP mitocondrial (figura 1.12). Por otro lado, también se piensa que al menos en el corazón el  $\text{Ca}^{2+}$  es capaz de activar a la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa (Balaban, 2009), posiblemente mediante la liberación de un péptido inhibitorio, lo que también contribuiría a una mayor síntesis de ATP en la mitocondria. También se sabe que el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en la matriz mitocondrial en forma de precipitados de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato (Chalmers y Nicholls, 2003; Kristian et al., 2007).

### 3.1) TRANSPORTE DE CALCIO EN LA MITOCONDRIA.

Los sistemas de entrada y salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria se muestran en la figura 1.12.



**Figura 1.12. Homeostasis del calcio en la mitocondria de mamífero.** La figura muestra los sistemas de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria en azul: uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaU), intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  (HCX) e intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX). El intercambiador NCX está acoplado al intercambiador  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  (NHE). El  $\text{Ca}^{2+}$  puede formar precipitados con el fosfato en la matriz mitocondrial. Los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$  se muestran con flechas verdes. Los CaMC se muestran en verde y se indican sus motivos EF. Las proteínas implicadas en la síntesis de ATP se muestran en rosa. Los movimientos de protones (a través de la cadena respiratoria ETC,  $\text{H}^+$ -ATP sintasa, transportador de fosfato PiC, AGC, HCX y NHE) se muestran con flechas rojas. El  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial activa los CaMC; el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial activa las deshidrogenasas del ciclo de Krebs (TCA) y posiblemente también la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa (línea discontinua). Modificado de Demarex et al., 2009.

#### 3.1.1. Sistemas de entrada de $\text{Ca}^{2+}$ : uniportador de $\text{Ca}^{2+}$ (CaU).

La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria tiene lugar a través del CaU, de naturaleza molecular desconocida (Saris y Carafoli, 2005), y depende de gradiente electroquímico, esto es, del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) y del gradiente de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el citosol y la mitocondria (Gunter y Gunter, 1994). Además de  $\text{Ca}^{2+}$ , el uniportador es capaz de transportar otros metales bivalentes como el  $\text{Sr}^{2+}$  y el  $\text{Mn}^{2+}$  (Gunter y Gunter, 1994). El  $\text{Mg}^{2+}$ , por el contrario, puede inhibir su actividad (Saris y Carafoli, 2005). La afinidad del uniportador por el  $\text{Ca}^{2+}$  es baja (Saris y Carafoli, 2005), ya que concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (100-200 nM) no lo activan, y su  $S_{0.5}$  está alrededor de 20  $\mu\text{M}$ .

El CaU se puede inhibir en mitocondria aislada por rojo de rutenio (RR) a una concentración de 200 nM, o por su análogo permeable Ru360 (Gunter y Gunter, 1994).

### 3.1.2. Sistemas de eflujo de $\text{Ca}^{2+}$ :

#### A) Intercambiador $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ :

Se encuentra presente mayoritariamente en tejidos no excitables, como el hígado, riñón y pulmones (Saris y Carafoli, 2005). Intercambia un ion  $\text{Ca}^{2+}$  por 2 iones  $\text{H}^+$  y es insensible a RR. La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de energía, por tanto, al depender del gradiente de protones. Recientemente se ha descubierto un posible intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, la proteína Letm1, pero no está claro que se trate del intercambiador que mencionamos aquí, ya que es inhibido por RR y su estequiometría parece ser diferente (Jiang et al., 2009). Por tanto, la naturaleza proteica del intercambiador  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$  sigue siendo desconocida.

#### B) Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ :

Se encuentra presente mayoritariamente en tejidos excitables, como el cerebro o el músculo, y ausente en hígado (Saris y Carafoli, 2005). Intercambia un ion  $\text{Ca}^{2+}$  por 3 iones  $\text{Na}^+$  y es insensible a RR. Su naturaleza proteica es desconocida (Gunter y Pfeiffer 1990; Gunter y Gunter, 1994; Saris y Carafoli, 2005). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este intercambiador también depende del gradiente de protones, ya que el  $\text{Na}^+$  es de nuevo intercambiado por protones en un intercambio  $\text{H}^+/\text{Na}^+$  (Gunter y Gunter, 1994).

### 3.2) SEÑALIZACIÓN POR CALCIO A LA MITOCONDRIA A TRAVÉS DE LOS CaMCs.

La presencia de motivos de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo *EF-hand* en los CaMC sugiere que la actividad transportadora de estos transportadores podría estar regulada por  $\text{Ca}^{2+}$  (Satrústegui et al., 2007). El hecho de que los motivos EF estén orientados hacia el espacio intermembrana implica que los transportadores serían regulados por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial (Palmieri et al., 2001). Por tanto, los CaMC constituirían un nuevo mecanismo de transmitir señales de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólicas a la mitocondria sin necesidad de que el ion entre dentro del orgánulo (figura 1.12).

AGC1 y AGC2 (aralar y citrina), que forman parte de la lanzadera de NADH de aspartato/malato, son estimulados por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial con unas  $S_{0.5}$  de 280-350 nM y 100-150 nM respectivamente, y la estimulación es de 3 y 1,5 veces respectivamente (Contreras et al., 2007). Por tanto, estos transportadores serían activados por señales de  $\text{Ca}^{2+}$  pequeñas, que no llegan a activar al CaU, y que no entran en la matriz mitocondrial (Pardo et al., 2006; Mármol et al., 2009). Estas señales pequeñas de  $\text{Ca}^{2+}$  permitirían la transferencia de equivalentes de reducción del NADH desde el citosol a la mitocondria a través de la lanzadera. De hecho, señales mas grandes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que activan el uniportador, entran en la matriz y estimulan las deshidrogenasas mitocondriales, inhiben la lanzadera en algunos tejidos como corazón y cerebro (Contreras y Satrústegui, 2009).

Los transportadores de ATP-Mg/Pi se activan por concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondriales mayores que los AGCs, más similares a las que activan al CaU. Estudios de Aprille determinaron que la  $S_{0.5}$  del transportador de hígado está en torno a 1  $\mu\text{M}$  (Aprille, 1993). Por tanto, es de esperar

que estos transportadores se activen con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  que sí entran en la mitocondria, y que además estimulan el metabolismo mitocondrial a través de la estimulación de las deshidrogenasas mitocondriales.

### 3.3) SEÑALIZACIÓN POR CALCIO A LA MITOCONDRIA DE LEVADURA.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es una excepción en cuanto a la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria. Este organismo carece del CaU (Carafoli et al., 1970; Carafoli y Lehninger, 1971) y por tanto no se observa captura de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondria aislada. Además, las deshidrogenasas del ciclo de Krebs son insensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  (Nichols et al., 1994).

Por otra parte, el transportador de aspartato/glutamato Agc1p no posee motivos EF en su largo extremo N-terminal (Cavero et al., 2003), y por tanto la lanzadera de NADH de malato/aspartato también es insensible a  $\text{Ca}^{2+}$ . Todos estos datos sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  no parece modificar el metabolismo mitocondrial en la levadura. Sin embargo, la proteína Sallp, que pertenece a la familia SCaMC si posee dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  en su extremo N-terminal, y podría ser el primer mecanismo de señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria de levadura.

## 4. PORO DE TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD (PTP).

La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula de mamífero es muy tóxica, y causa la activación masiva de proteasas y fosfolipasas (Gunter y Pfeiffer 1990). El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (*permeability transition pore*, PTP) es un canal de alta conductancia no específico de naturaleza proteica que se genera en la membrana mitocondrial interna en condiciones de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y/o estrés oxidativo (Zoratti y Szabò, 1995; Bernardi et al., 2006; Leung y Halestrap, 2008). Su naturaleza molecular es aún objeto de debate, aunque su implicación en la muerte celular por necrosis, por ejemplo en situaciones de isquemia-reperfusión, está claramente demostrada (Baines et al., 2005; Schinzel et al., 2005; Nakagawa et al., 2005).

### 4.1) Reguladores del PTP:

El inductor principal del PTP en mitocondria aislada es un exceso en la captura de  $\text{Ca}^{2+}$ , aunque no se conoce cuál es la diana en la matriz donde el catión actúa. Otros factores, como las especies reactivas de oxígeno, pueden acelerar su apertura al disminuir la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  (Zoratti y Szabò, 1995). El  $\text{Mg}^{2+}$  es un inhibidor del PTP, aunque el sitio donde actúa es desconocido. Se piensa que podría competir con el  $\text{Ca}^{2+}$  por su diana en la matriz (Zoratti y Szabò, 1995).

El fosfato puede tener una doble acción: en ausencia de nucleótidos de adenina es un potente inductor del PTP (Zoratti y Szabò, 1995), mientras que en presencia de éstos (Vitorica y Satrústegui, 1985) o de ciclosporina A (CsA) (Basso et al., 2008) se convierte en inhibidor. La apertura del PTP se ve favorecida cuando el  $\Delta\Psi$  mitocondrial es bajo y/o el pH es alto, y es retardada cuando la mitocondria está hiperpolarizada y/o el pH es bajo (Bernardi et al., 2006).

Los nucleótidos de adenina ADP y ATP a bajas concentraciones (100  $\mu\text{M}$  o menos) son potentes inhibidores del PTP (Zoratti y Szabò, 1995). Su diana de inhibición parece ser el ANT, ya que las

concentraciones inhibitoras del nucleótido coinciden con la afinidad de transporte. Posiblemente, la presencia de nucleótidos de adenina promueve la forma “m” del transportador, la cual inhibe la apertura del PTP (Zoratti y Szabò, 1995). Sin embargo, algunos estudios sugieren que podría haber una segunda diana de menor afinidad, en torno a 1 mM (Gizatullina et al., 2005).

Estimuladores del PTP	Mecanismo o sitio de interacción	Inhibidores del PTP	Mecanismo o sitio de interacción
Pi	Desconocido. También otros aniones, como $As_i$ y $V_i$ (Basso et al., 2008)	Pi	Necesario para inhibir el PTP con CsA y nucleótidos (Basso et al., 2008; Vitorica y Satrústegui, 1985) ¿Tamponamiento de $Ca^{2+}$ ?
		$Mg^{2+}$	Desconocido. ¿Compite con el $Ca^{2+}$ por su diana? (Zoratti y Szabò, 1995)
CAT	Fija al ANT en la conformación “c”, estimuladora del PTP (Bernardi et al., 2006)	BKA	Fija al ANT en la conformación “m”, inhibidora del PTP (Bernardi et al., 2006)
Alto pH		Bajo pH	Protonación de histidinas en algunos MC (Bernardi et al., 2006) ¿Los protones compiten con el $Ca^{2+}$ por su diana? (Zoratti y Szabò, 1995)
Despolarización mitocondrial	¿Sensor de voltaje formado por argininas en alguna diana desconocida? (Bernardi et al., 2006)	Hiperpolarización mitocondrial	¿Aumenta la unión de ADP al ANT?
		<i>AdN</i>	Promueven la conformación “m” del ANT, inhibidora del PTP
Estrés oxidativo	Oxidación de cisteínas en el ANT y otros MC		
		CsA y análogos	Inhiben la CyP-D

**Tabla 1.5. Reguladores del PTP**

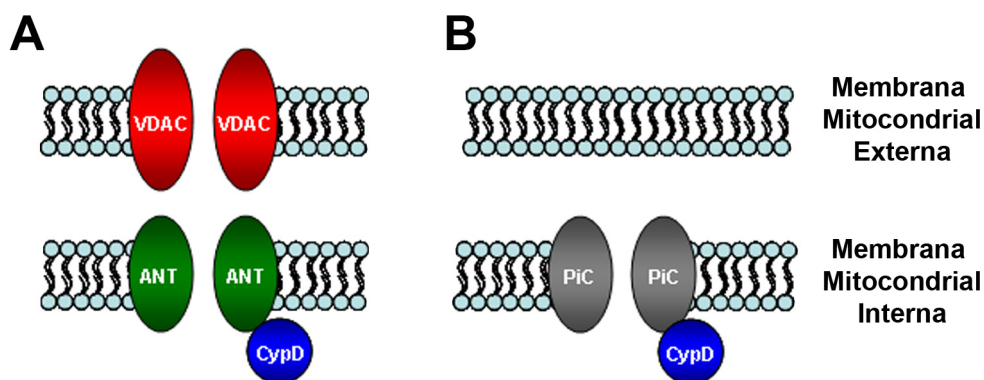
## 4.2) Componentes moleculares del PTP:

Los componentes moleculares teóricos del PTP se dedujeron a partir del uso de inhibidores específicos (Zoratti y Szabò, 1995):

- Inhibidores del ANT: el CAT estimula potentemente su apertura, mientras que el BKA la inhibe. Parece, por tanto, que la conformación “c” del transportador favorece la apertura del PTP, mientras que la conformación “m” la inhibe.
- Inhibidores de ciclofilina D (CyP-D): la apertura del canal es inhibida por los inhibidores de CyP-D, CsA y análogos.

Los componentes teóricos del PTP se muestran en la figura 1.13A y son:

- El transportador de ADP/ATP (ANT).
- El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) de la membrana externa mitocondrial, también llamado porina.
- La CyP-D, una peptidil-prolil isomerasa de la matriz mitocondrial.



**Figura 1.13. Componentes del PTP.** A) Modelo clásico de los componentes del PTP. Consta de VDAC en la membrana mitocondrial externa, ANT en la membrana interna, y CyP-D. B) Modelo actual del PTP. Se ha descartado a ANT y VDAC como componentes del poro. CyP-D sigue presente. Se piensa que el transportador de fosfato (PiC) es el componente central del poro (Leung y Halestrap, 2008). Modificado de Baines, 2009.

Sin embargo, mitocondrias sin ANT en la membrana interna, obtenidas de ratones con deficiencia hepática en ANT1 y ANT2, son capaces de sufrir la apertura del PTP, aunque se requiere más  $\text{Ca}^{2+}$  para activarlo y se vuelve insensible a los inhibidores del transportador, CAT y BKA (Kokoszka et al., 2004). Por tanto, los ANT deberían ser considerados ahora como reguladores del PTP, pero no como componentes esenciales. Que sean reguladores del poro no es sorprendente si se tiene en cuenta que el ANT es la proteína más abundante de la membrana mitocondrial interna (Giraud et al., 1998), y probablemente sus cambios de conformación “m” a conformación “c” afectan profundamente a la membrana interna. Por otro lado, mitocondrias sin las tres isoformas de VDAC son capaces de sufrir



la apertura del PTP exactamente igual que mitocondrias control (Baines et al., 2007), lo que descarta la implicación de este canal de la membrana externa en la composición del poro.

La CyP-D sí parece ser un componente del PTP. Mitocondrias de ratones deficientes en CyP-D se comportan como si estuvieran siempre incubadas en presencia de CsA, ya que se requiere mucho más  $\text{Ca}^{2+}$  para activarlo (Baines et al., 2005; Basso et al., 2005; Schinzel et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Por tanto, es el único de los componentes originales que sigue presente en el modelo (figura 1.13B). Además se ha propuesto recientemente que el transportador mitocondrial de fosfato (PiC, SLC25A3) ocuparía el lugar central del poro (Leung y Halestrap, 2008).

#### 4.3) Implicación del PTP en apoptosis o necrosis:

La apertura del PTP causa el paso de protones y otros iones a través de la membrana mitocondrial interna y provoca la despolarización completa de la mitocondria (Bernardi et al., 2006). Esta pérdida de la fuerza protón motriz no sólo inhibe la síntesis de ATP mitocondrial, sino que además provoca su hidrólisis por la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa mitocondrial funcionando en sentido reverso (Bernardi et al., 2006). La pérdida del ATP celular provoca grandes alteraciones en la homeostasis iónica, y finalmente se produce la muerte por necrosis a través de la activación de nucleasas y proteasas (Gunter y Pfeiffer 1990).

La importancia del PTP en la muerte celular necrótica en cerebro, corazón e hígado se propuso en primer lugar mediante el uso de inhibidores como la CsA, y, recientemente se ha confirmado mediante el uso de ratones deficientes en CyP-D. Estos ratones son más resistentes al daño por isquemia/reperfusión en cerebro y corazón que los ratones control (Baines et al., 2005; Schinzel et al., 2005; Nakagawa et al., 2005).

La implicación del PTP en la muerte por apoptosis se ha debatido recientemente utilizando también estos ratones (Nakagawa et al., 2005). Las células sin CyP-D mueren de forma normal tras la adición de estímulos apoptóticos (estaurosporina,  $\text{TNF-}\alpha$ , rayos-X), pero son resistentes a estimuladores de necrosis como  $\text{H}_2\text{O}_2$  o ionóforo A23187 (Nakagawa et al., 2005). También se produce la liberación de citocromo C de mitocondria aislada de células sin CyP-D tras el tratamiento con Bax y Bid, proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 (Nakagawa et al., 2005). Estos resultados sugieren que la muerte apoptótica no depende del PTP. Esto es lógico, por otra parte, ya que los ratones sin CyP-D no muestran un fenotipo aparente, mientras que los procesos de muerte celular por apoptosis son fundamentales durante el desarrollo embrionario.

#### 4.4) Particularidades de la mitocondria de levadura.

El hecho de que la mitocondria de levadura sea incapaz de captar  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli et al., 1970; Carafoli y Lehninger, 1971) sugiere que probablemente no existe PTP en dicha mitocondria, o al menos no un PTP similar al de mamíferos. Estudios en mitocondria aislada pusieron de manifiesto, sin embargo, que existe un canal de composición molecular desconocida en la membrana mitocondrial interna (YMUC: *yeast mitochondrial unspecific channel*) que se abre en presencia de sustratos respiratorios o ATP cuando el fosfato del medio externo es bajo (Prieto et al., 1992, 1995; Manon et al., 1998). Este canal es inhibido por  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Ca}^{2+}$  en la cara externa (Pérez-Vázquez et al., 2003).

Por tanto, la regulación de este canal es muy diferente de la de mamíferos, como se muestra en la tabla 1.7: por ejemplo, el ATP lo estimula y el fosfato lo inhibe, al contrario que en mamíferos; la CsA no tiene ningún efecto inhibitorio, pero sin embargo, el  $Mg^{2+}$  lo inhibe, al igual que en mamíferos. No se conoce la función fisiológica de este canal *in vivo*, aunque no parece que esté implicado en la muerte de la levadura por necrosis. Algunos autores han sugerido que dicho canal está activo constitutivamente cuando el ATP es alto en el citosol (por ejemplo, cuando la levadura crece en glucosa) y se inhibe cuando hay una depleción celular de ATP (Manon y Guérin, 1998). Esto estimularía la síntesis de ATP en la mitocondria en esas condiciones.

	Mitocondria de mamíferos	Mitocondria de levaduras	Referencia
Tamaño	1,5 kDa	1,1 kDa	
Fosfato	Estimulador	Inhibidor	Jung et al., 1997
ATP	Inhibidor	Estimulador	Prieto et al., 1995
ADP	Inhibidor	Inhibidor	Roucou et al., 1997
$Mg^{2+}$	Inhibidor	Inhibidor	Perez-Vazquez et al., 2003
$Ca^{2+}$	Estimulador	Inhibidor a altas concentraciones	Perez-Vazquez et al., 2003
CsA	Inhibidor	Sin efecto	Jung et al., 1997
Implicado en muerte por apoptosis y/o necrosis	Sí	No se sabe	
Transportador de ADP/ATP	No forma parte del canal	No forma parte del canal	Roucou et al., 1997
VDAC/porina	No forma parte del canal	No forma parte del canal	Gutierrez-Aguilar et al., 2007

**Tabla 1.6. Diferencias y semejanzas entre el PTP de mamíferos y el YMUC de levaduras**



## Objetivos

---



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es la caracterización funcional de los transportadores mitocondriales de ATP-Mg/Pi y su regulación por calcio. Nos hemos planteado los siguientes objetivos concretos:

### 1) Estudio del transportador de ATP-Mg/Pi en un modelo de levadura:

- a) Generación de un método para estudiar los cambios en el contenido de ATP de la mitocondria aislada de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- b) Estudio de la actividad transportadora y regulación por calcio del transportador Sal1p en levadura.
- c) Estudio del papel fisiológico de Sal1p y su relación con los transportadores de ADP/ATP en la levadura.

### 2) Estudio del transportador de ATP-Mg/Pi en tejidos de ratón:

- a) Estudio de la actividad transportadora y regulación por calcio del transportador SCaMC-3.
- b) Estudio del papel de SCaMC-3 en la regulación de la capacidad de acumulación de calcio y de la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) en mitocondrias de hígado y cerebro de ratón.

### 3) Estudio del transportador de ATP-Mg/Pi en líneas celulares:

- a) Generación de un método para estudiar los cambios en el contenido de ATP de la mitocondria aislada de líneas celulares.
- b) Estudio de la actividad transportadora y regulación por calcio del transportador SCaMC-1.
- c) Estudio del papel de SCaMC-1 en la regulación de la capacidad de acumulación de calcio y de la apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) en mitocondrias de líneas celulares.
- d) Estudio del papel de SCaMC-1 en la muerte necrótica de células en cultivo.



## **Materiales y Métodos**

---



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. EXPERIMENTOS CON LEVADURAS.

#### 1.1) CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*.

En la tabla 3.1 se detallan las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas durante la realización de esta tesis.

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>W303 1B</b>	MAT $\alpha$ ; <i>ura3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, leu2-3, his3-11, ade2-1, can1-100</i>	Cavero et al., 2005
<i>sal1<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>ura3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, leu2-3, his3-11, ade2-1, can1-100; ynl083w::KANMX4</i>	Zuniga et al., 1999 Cavero et al., 2005
<i>aac1,2,3<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>aac1::LEU2-3, aac2::HIS3-11, aac3::URA3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, ade2-1, can1-100</i>	Drgon et al., 1991
<i>aac1,2<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>aac1::LEU2-3, aac2::HIS3-11, ura3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, ade2-1, can1-100</i>	Cavero et al., 2005
<i>aac2,3<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3, aac2::HIS3-11, aac3::URA3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, ade2-1, can1-100</i>	Cavero et al., 2005
<i>aac2<math>\Delta</math></i>	MAT $\alpha$ ; <i>leu2-3, aac2::HIS3-11, ura3-1, trp1-<math>\Delta</math>2, ade2-1, can1-100</i>	Cavero et al., 2005

**Tabla 3.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.**

La cepa *sal1 $\Delta$*  carece del gen *SAL1*, que ha sido interrumpido por el módulo *KanMX4*. *SAL1* codifica para la proteína Sal1p, que es el representante de la familia SCaMC en levadura. Esta cepa no presenta ningún fenotipo aparente. Crece perfectamente tanto en fuentes de carbono fermentables (glucosa, galactosa-rafínosa) como en fuentes no fermentables (lactato, piruvato, acetato, galactosa). Fue proporcionada por el laboratorio del Dr. Juan Pedro García Ballesta (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

Las cepas *aac2 $\Delta$* , *aac2,3 $\Delta$* , *aac1,2 $\Delta$*  y *aac1,2,3 $\Delta$*  carecen de los genes *AAC1*, *AAC2* y *AAC3*, que codifican para los transportadores de ADP/ATP (AACs), Aac1p, Aac2p y Aac3p. Las cepas sin *AAC2* sólo pueden crecer en fuentes fermentables, como la glucosa. Fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Jordan Kolarov (Comenius University, Bratislava).

#### 1.2) MEDIOS DE CULTIVO DE LEVADURAS.

Para los experimentos con mitocondrias aisladas se sembró previamente un preinóculo en medio mínimo (MM) con glucosa como fuente de carbono (base nitrogenada de levaduras (YNB) sin aminoácidos 0,17 %, sulfato amónico 0,5 %, glucosa 0,2 %, pH 4,5) suplementado con los aminoácidos o bases nitrogenadas necesarias (L-leucina 30  $\mu$ g/mL, L-triptófano 20  $\mu$ g/mL, L-histidina 20  $\mu$ g/mL,

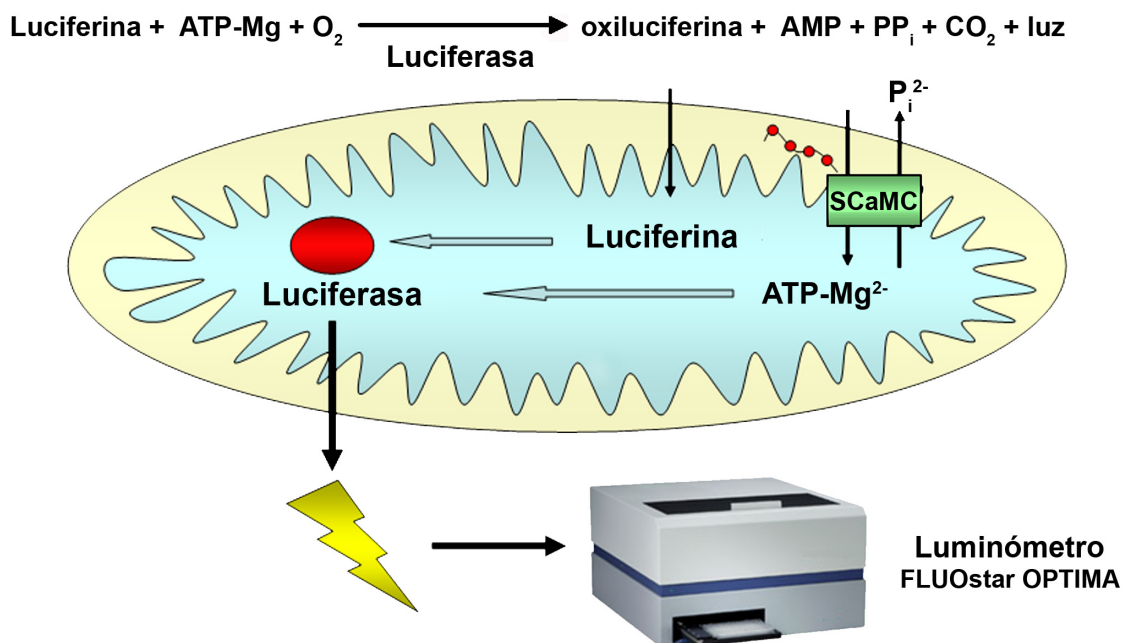
adenina 20 µg/mL y uracilo 20 µg/mL). Posteriormente el preinóculo se diluyó hasta una densidad óptica inicial a 600 nm de 0,1 en medio rico YPGR (extracto de levadura 1 %, bactopectona 2 %, galactosa 2 % y rafinosa 2%).

La selección de la cepa *sal1Δ*, resistentes a G418, se realizó utilizando el antibiótico a una concentración de 200 µg/mL en medio rico.

Las levaduras transformantes que expresan luciferasa se seleccionaron en placas de medio mínimo sintético (SM) con glucosa como fuente de carbono (YNB 0,67 %, sulfato de amonio 0,12 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %, glucosa 2 %, pH 4,5) a las que se añadieron los suplementos necesarios exceptuando leucina (para los casos en que se utilizaron los plásmidos de tipo pYX142) o uracilo (cuando se usaron los plásmidos de tipo pYeDP). Las placas de los diferentes medios se prepararon añadiendo agar 2 %.

### 1.3) CONTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN DE LA LUCIFERASA.

Uno de los objetivos de este trabajo fue generar un sistema para estudiar a tiempo real y de forma eficiente los cambios en los niveles de ATP en la mitocondria. El sistema generado se basa en la expresión de la proteína luciferasa en la matriz mitocondrial. La luciferasa es una enzima del insecto *Photinus pyralis*, cuyos sustratos son ATP-Mg y luciferina, y uno de cuyos productos es la emisión de luminiscencia. Por medio de esta herramienta se pueden detectar cambios en los niveles de ATP mitocondrial midiendo la luminiscencia generada en un luminómetro (figura 3.1).



**Figura 3.1. Sistema para detectar los niveles de ATP mitocondrial basado en la enzima luciferasa dirigida a este orgánulo.** La luciferasa utiliza como sustratos luciferina y ATP, y genera como producto luminiscencia que podemos registrar en un luminómetro. Si generamos una enzima dirigida a la matriz mitocondrial podemos medir los niveles de ATP mitocondrial. Además podremos estudiar la actividad de proteínas que transporten ATP, como las ScaMCs o los AACs.



Para generar el plásmido de expresión de la luciferasa mitocondrial, la secuencia codificante para la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* fue fusionada con la secuencia codificante para la señal de localización mitocondrial de la proteína Cox4p de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 3.2). Los primeros 25 aminoácidos de esta proteína han sido utilizados previamente para dirigir proteínas a la mitocondria de levadura (Hurt et al., 1985).

La secuencia de la luciferasa fue amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del plásmido pXNEO62-Luc (proporcionado por el Dr. Manuel Soto, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) utilizando los oligonucleótidos Luc1 y Luc2 (tabla 3.2). Los oligonucleótidos elegidos eliminan el codón de iniciación y los últimos tres codones, que codifican para los tres últimos aminoácidos, serina, lisina y leucina (SKL). Dichos aminoácidos funcionan como secuencia señal de peroxisomas (Sommer et al., 1992). El fragmento obtenido se clonó en el plásmido pSTBlue-1 (vector pSTBlue-1-Luc).

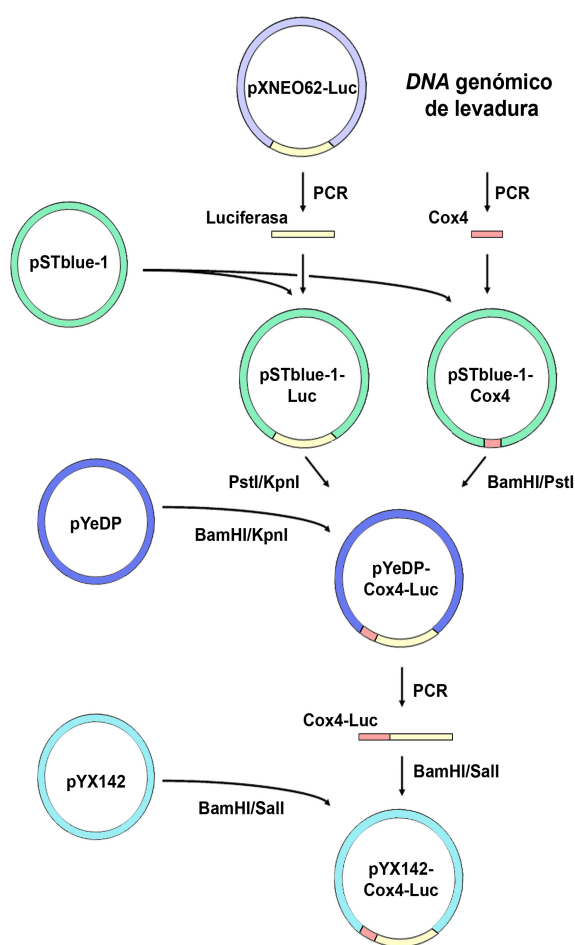
Los primeros 75 nucleótidos del gen *COX4* fueron amplificados mediante PCR a partir de *DNA* genómico de la cepa W303 utilizando los oligonucleótidos Cox41 y Cox42 (tabla 3.2). El fragmento obtenido se clonó también en el plásmido pSTBlue-1. Las secuencias de la luciferasa y de Cox4p fueron fusionadas en fase y clonadas en el plásmido pYeDP, a continuación del promotor inducible Gal-10 (figura 3.2).

Nombre	Secuencia	Adiciones
<b>Cox41</b> (directo)	5'-cgggatcc <b>ATG</b> CTTTCACCTACGTCAA-3'	diana BamHI; codón de iniciación (en negrita)
<b>Cox42</b> (inverso)	5'-aactgcagAAGCAGATATCTAGAGCT-3'	diana PstI
<b>Luc1</b> (directo)	5'-aactgcagGAAGACGCCAAAAACATA-3'	diana PstI
<b>Luc2</b> (inverso)	5'-ggggtacc <b>TTA</b> CTTTCGCCCTTCTTGGCC-3'	diana KpnI; codón de parada (en negrita)
<b>Luc3</b> (inverso)	5'-gcgtcgacCTTTCGCCCTTCTTGGC-3'	diana SalI

**Tabla 3.2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar la luciferasa y *COX4*.**

Para generar un plásmido de expresión constitutiva se amplificó mediante PCR la fusión Cox4-luciferasa utilizando los oligonucleótidos Cox41 y Luc3 (tabla 3.2). El fragmento obtenido se clonó en el plásmido pSTBlue-1. A continuación se extrajo mediante digestión con BamHI y SalI y se subclonó en el vector pYX142, a continuación del promotor de expresión constitutiva TPI (figura 3.2). Las secuencias se verificaron por secuenciación.

Las levaduras se hicieron competentes según el método del acetato de litio y se transformaron mediante choque térmico a 42°C (Schiestl y Gietz, 1989).



**Figura 3.2. Generación de los plásmidos de expresión de la luciferasa mitocondrial.** La secuencia de la luciferasa se obtuvo por PCR a partir del plásmido pXNEO62-Luc, mientras que la presecuencia de *COX4* se obtuvo por PCR a partir de *DNA* genómico de levadura. Se generaron dos plásmidos. El vector pYeDP-Cox-Luc está regulado por el promotor Gal-10, que es inducible por galactosa. El vector pX142-Cox4-Luc está regulado por el promotor TPI (promotor de la enzima triosa fosfato isomerasa), de expresión constitutiva.

#### 1.4) AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE LEVADURA.

Para el aislamiento de mitocondrias se siguió el protocolo de Arechaga y colaboradores (Arechaga et al., 1993), que se detalla a continuación.

Las levaduras se centrifugaron a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con H<sub>2</sub>O bidestilada. El sedimento de levaduras se resuspendió en tampón β-SH (Tris-HCl 0,1 M, β-mercaptoetanol 0,5 M, pH 9,3), cuya función es romper los puentes disulfuro de la pared celular de la levadura, debilitándola y facilitando así su posterior degradación enzimática, y se incubó durante 10 minutos a 32 °C, centrifugando después a 8.000 x g durante 5 minutos a 4°C. Para eliminar el exceso de β-mercaptoetanol, se lavó 3 veces con tampón Tris-KCl (Tris-HCl 10 mM, KCl 0,5 M, pH 7), centrifugando cada vez en las mismas condiciones anteriores.

Las levaduras se incubaron entonces durante una hora a 30°C en tampón de digestión (sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,5), al que se añadió la enzima Zymolyasa 100T (Seikagaku) a 0,2 mg/mL, que tiene la función de degradar la pared celular de la levadura, formando protoplastos.

Una vez obtenidos, los protoplastos se centrifugaron a 13.000 x g durante 5 minutos a 4°C y se lavaron 3 veces con tampón de protoplastos (sorbitol 0,75 M, manitol 0,4 M, trizma-maleato 10 mM, BSA 0,1 %, pH 6,8) en las mismas condiciones, eliminando así los restos de pared producto de la digestión. Después se resuspendieron en tampón de homogeneización (manitol 0,6 M, trizma-

maleato 10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 mM, BSA 0,2 %, pH 6,8), al que se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas con Pepstatina A 1  $\mu\text{gr}/\text{mL}$  y PMSF 1 mM y se homogeneizaron con un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón acoplado a un taladro.

El homogeneizado se centrifugó 5 minutos a 2.500 rpm en un rotor SS34 (Sorvall), recogiendo tanto el sedimento como el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en tampón de homogeneización y se centrifugó de nuevo. Se desechó el nuevo sedimento y se recogió el sobrenadante. Los dos sobrenadantes se centrifugaron a continuación 10 minutos a 10.000 rpm en un rotor SS34 para obtener un sedimento de mitocondrias. Los sedimentos de mitocondrias fueron resuspendidos, combinados y lavados varias veces para eliminar restos de otras fracciones. El proceso se detalla en la figura 3.3. El sedimento final de mitocondrias se resuspendió en tampón de homogeneización. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

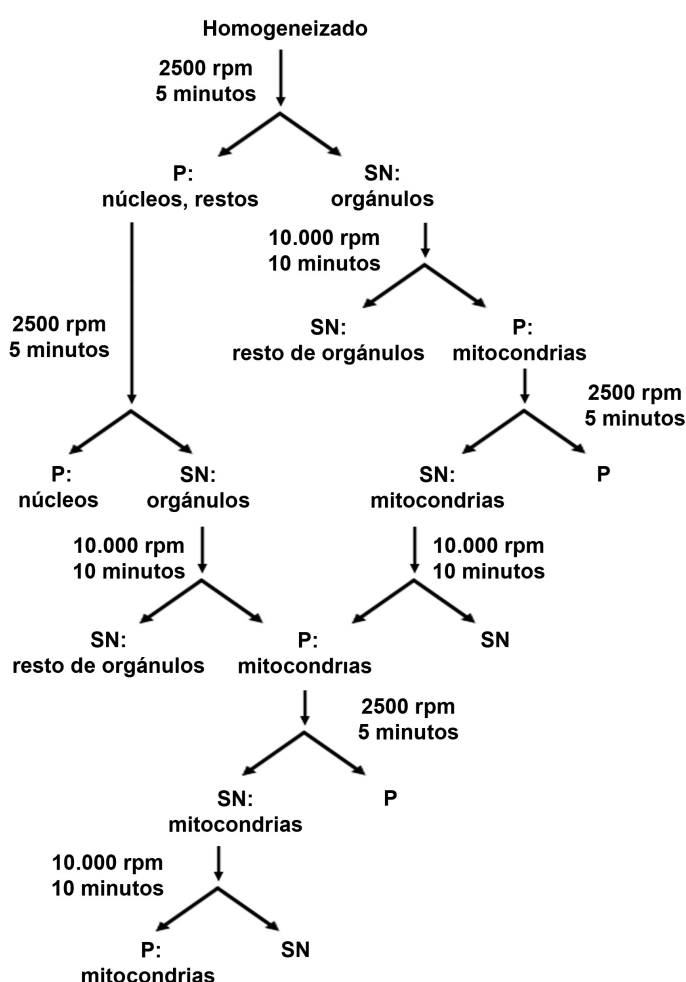


Figura 3.3. Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de levadura. SN, sobrenadante, P, sedimento.

### 1.5) SUBFRACCIONAMIENTO DE LA MITOCONDRIA.

La mitocondria se separó en mitoplastos y espacio intermembrana por choque osmótico como se ha descrito previamente (Daum et al., 1982). Brevemente, se diluyó la suspensión de mitocondrias (en manitol 0,6 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,4) con 5 volúmenes de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), de manera que el manitol queda a una concentración final de 0,1 M. La suspensión se agitó suavemente

a 0 °C durante 20 minutos y después se centrifugó a 48.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante contiene el espacio intermembrana y el sedimento contiene los mitoplastos.

Para separar la matriz mitocondrial de las fracciones de membrana, los mitoplastos se resuspendieron en Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y se dejaron a 0 °C durante 5 minutos para permitir el hinchamiento total de la matriz mitocondrial y la ruptura de la membrana interna. Después, se añadió un tercio del volumen de tampón hiperosmótico (sacarosa 1,8 M, ATP 8 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, pH 7,4) y se dejó la suspensión a 0 °C durante 5 minutos, tras lo cual se sonicó durante 15 segundos y se centrifugó a 110.000 x g durante 60 minutos. El sobrenadante contiene la matriz mitocondrial y el sedimento contiene las membranas mitocondriales (Daum et al., 1982).

Para comprobar la pureza de las fracciones, se utilizó como marcador de la matriz mitocondrial la citrato sintasa (reacción según Srere, 1969), y como marcador del espacio intermembrana el citocromo b2 (reacción según Appleby y Morton, 1959).

## 1.6) DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.

Las muestras de proteínas se separaron en geles de poliacrilamida/SDS al 10 %. Las proteínas se transfirieron después a membranas de nitrocelulosa mediante electrotransferencia.

Para detectar Sal1p en mitocondrias y otras fracciones de levadura se utilizó un anticuerpo policlonal específico contra la región N-terminal del transportador (aminoácidos 1-188) generado en conejo en nuestro laboratorio (Cavero et al., 2005). El anticuerpo anti-Sal1p se utilizó a dilución 1:5.000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo generado en cabra que reconoce inmunoglobulinas de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (GarPO: *Goat Anti-Rabbit Polyclonal*, Biorad) a dilución 1:10.000.

Para detectar la luciferasa se utilizó un anticuerpo policlonal generado en cabra (Promega) a una dilución 1:2.000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo generado en burro que reconoce inmunoglobulinas de cabra acoplado a peroxidasa de rábano (Jackson Immunoresearch), a dilución 1:5000.

Como control de carga se utilizó un anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la proteína Porina de la membrana mitocondrial externa de la levadura (Molecular Probes) a dilución 1:5.000. Como secundario se utilizó un anticuerpo generado en caballo que reconoce inmunoglobulinas de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HamPO: *Horse Anti-Mouse Polyclonal*, Vector Laboratories) a dilución 1:1.000.

El revelado de las membranas se llevó a cabo con el sistema ECL (Amersham) por exposición en películas de rayos X (Agfa).

## 1.7) INMUNOFLUORESCENCIA EN LEVADURAS

Para detectar la luciferasa mitocondrial en ensayos de inmunofluorescencia las células transformadas con el vector pYeDP-Cox-Luc se cultivaron en medio rico YPD (extracto de levadura 1 %, bactopectona 2 % y glucosa 2 %) hasta fase exponencial y después se transfirieron a YPGR durante 5-6 horas. Después las células se incubaron con la sonda fluorescente mitocondrial MitoTracker

Red CMXRos (Molecular Probes), a una concentración de 50 nM, durante 30 minutos a 30 °C. Posteriormente se hicieron dos lavados con PBS, tras los cuales las células se procesaron utilizando el protocolo de Bowers y colaboradores (Bowers et al., 2000). Se fijaron mediante la adición de formaldehído 3 % durante 15 minutos, seguido por una incubación a temperatura ambiente con paraformaldehído 4 % y K-fosfato 50 mM, pH 6,5 durante 16 horas. Después, se hizo un tratamiento con Zymolyasa 100T durante 45 minutos para convertir las células en esferoplastos, y con SDS 1 % durante 3 minutos para permeabilizarlos. Posteriormente se dejó que los esferoplastos permeabilizados se adhirieran a portaobjetos tratados con poli-(l-lisina). Se bloqueó la unión inespecífica de anticuerpos incubando las muestras con PBS, Tritón X-100 0,2 % y BSA 1 % durante dos horas. Para detectar la luciferasa se utilizó el anticuerpo policlonal (Promega) a una dilución 1:100. Como secundario se utilizó un anticuerpo generado en burro que reconoce inmunoglobulinas de cabra acoplado a fluoresceína (Jackson ImmunoResearch) a dilución 1:150. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Axiovert (Carl Zeiss) con un objetivo x100.

#### 1.8) MEDIDAS DE ATP EN MITOCONDRIAS PROCEDENTES DE LEVADURAS QUE EXPRESAN LA LUCIFERASA MITOCONDRIAL.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos dentro de un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. El volumen del ensayo fue de 100  $\mu$ L, y la concentración de proteínas mitocondriales de 1 mg/mL. Como tampón de ensayo se utilizó tampón de homogeneización suplementado con succinato 5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre entre 0,5  $\mu$ M y 30  $\mu$ M. Opcionalmente se añadió carboxiatractilósido (CAT, Calbiochem) 20  $\mu$ M para inhibir el transporte a través del AAC. Se inyectó en las muestras D-luciferina (Molecular Probes) 0,1 mM justo antes de empezar a medir la luminiscencia. Después de obtener una señal estable se inyectó ATP o ADP y se registraron los cambios en luminiscencia cada 10 segundos.

A la hora de comprobar el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  en el transporte de ATP se tuvo en cuenta que la luciferasa utiliza como sustrato ATP-Mg. Si se disminuye la concentración de  $\text{MgCl}_2$  del medio se corre el riesgo de que la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  presente en la matriz mitocondrial no sea suficiente para todo el ATP que entra. Por ello, no se podría saber si la disminución en la luminiscencia se debe a menor transporte de ATP o a menor actividad de la luciferasa. Por tanto, antes de comenzar los experimentos, se incubaron las mitocondrias durante 10 minutos a 30°C en un medio con  $\text{MgCl}_2$  10 mM. Existe una proteína en la membrana interna mitocondrial llamada Mrs2p que forma parte del sistema de entrada de  $\text{Mg}^{2+}$  a la mitocondria (Kolisek et al., 2003). Este procedimiento debería llenar la mitocondria de  $\text{Mg}^{2+}$ .

#### 1.9) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO LIBRE EN LOS MEDIOS.

A la hora de estudiar la dependencia de Sal1p de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  se añadió  $\text{CaCl}_2$  o EGTA a los medios para obtener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre indicada en las figuras. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre presente en los medios se determinó por fluorescencia utilizando el compuesto Calcium Green-5N (Molecular Probes) a concentración de 0,1  $\mu$ M. Se utilizó la fórmula  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{libre}} = K_d (F -$

$F_{min}) / (F_{max} - F)$  utilizando una  $K_d$  de 14  $\mu\text{M}$  (Gryniewicz et al., 1985), y se añadió EGTA-Tris pH 8 y  $\text{CaCl}_2$  para determinar la  $F_{min}$  y  $F_{max}$  respectivamente. La fluorescencia (excitación, 506 nm, emisión 532 nm) se midió en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA.

#### 1.10) CALIBRACIÓN DE LA LUCIFERASA RECOMBINANTE.

Para transformar las unidades de luz relativas dadas por el luminómetro en concentración de ATP, se debe utilizar una curva de calibración. La luciferasa muestra una cinética de Michaelis-Menten, con una  $K_m$  para ATP de 300  $\mu\text{M}$  aproximadamente (Zako et al., 2003; Branchini et al., 2000; Pellegatti et al., 2005; Gajewski et al., 2003). La  $K_m$  de la luciferasa observada en lisados mitocondriales con Tritón X-100 0,5 % tiene también este valor y está completamente saturada a niveles de ATP superiores a 1 mM. Por tanto, parece que esta enzima no es apropiada para analizar niveles de ATP *in vivo*, que normalmente son superiores a 1 mM. De hecho, ha habido grupos que han utilizado calibraciones *in vitro* con esta  $K_m$ , y los resultados de concentración de ATP que obtienen son muy inferiores a los niveles de ATP esperados (Gajewski et al., 2003). Por esta razón, se generó también una luciferasa alternativa, por mutagénesis dirigida, en la cual la lisina 529 fue sustituida por alanina. Esta mutación modifica la  $K_m$  para ATP que pasa a ser alrededor de 1,2 mM (Branchini et al., 2000). Dicha  $K_m$  se acerca más a la concentración de ATP fisiológica. Como contrapartida, la intensidad de la luz decae unas 1000 veces, lo que la hace poco útil para nuestros ensayos, ya que es más difícil de detectar y la relación señal/ruido disminuye. Esta construcción mutada no se utilizó en el resto de ensayos de esta tesis.

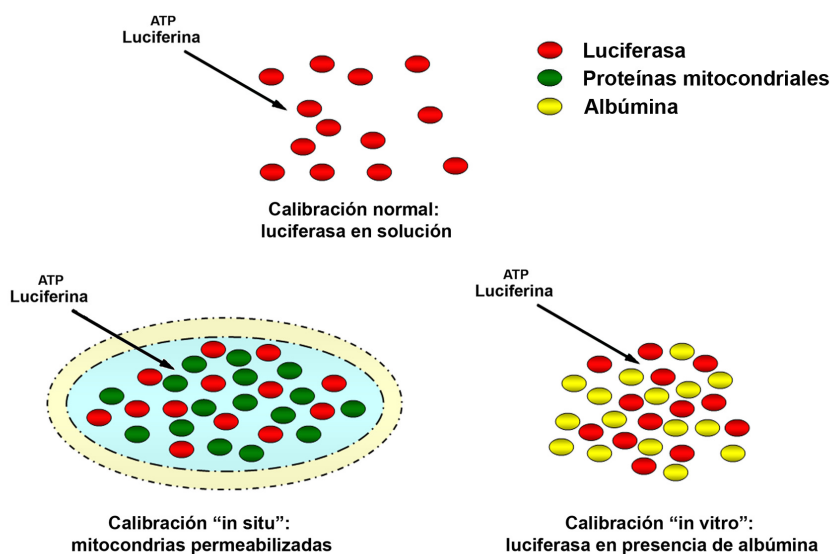
Sin embargo, muchos grupos han usado transfecciones de luciferasa salvaje y, realizando calibraciones *in vivo*, han obtenido resultados más acordes con los valores esperados. En células permeabilizadas con digitonina se ha visto que la luciferasa es capaz de responder a concentraciones de ATP de incluso 10 mM (Maechler et al., 1998; Kennedy et al., 1999). En la bacteria *E. coli* transformada con luciferasa y permeabilizada con polimixina se ha visto el mismo comportamiento (Allue et al., 1996). Parece, por tanto, que la luciferasa se comporta de muy distinta manera en solución que en compartimentos celulares. Su  $K_m$  para ATP aumenta hasta 1,5 mM aproximadamente en el interior de la célula. También se ha visto que la adición de altas cantidades de albúmina a luciferasa en solución, para simular los niveles intracelulares de proteínas, reproduce este efecto (Allue et al., 1996).

Se han utilizado estas dos aproximaciones para calibrar la luciferasa mitocondrial (figura 3.4). Por un lado, una calibración en lisados mitocondriales en presencia de BSA 180 mg/mL. Por otro, una calibración de la luciferasa en mitocondrias permeabilizadas con tolueno. En ambos casos se ha usado un volumen de reacción de 100  $\mu\text{l}$ , con una cantidad de proteína de 0,1 mg. El medio de calibración contiene manitol 0,6 M, trizma-maleato 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 mM, CoA 0,1 mM y 0,2 % BSA, pH 7,3. En la calibración con alta albúmina se añadió BSA 180 mg/mL y Triton X-100 0,5% para romper las mitocondrias.

La reacción tuvo lugar en placas de 96 pocillos. Se añadió al medio ATP a concentraciones que variaban entre 20  $\mu\text{M}$  y 10 mM. Se tuvo mucho cuidado en que el pH de los medios no variara, ya



que la luciferasa es muy dependiente del pH (Koop y Cobbold, 1993). Se inyecta D-luciferina 0,1 mM a las muestras justo antes de la lectura.



**Figura 3.4. Calibración de la luciferasa recombinante.** La calibración normal, empleada en la mayoría de los trabajos con luciferasa, utiliza luciferasa en solución. Nosotros hemos utilizado otras dos aproximaciones basadas en los trabajos del grupo de Cobbold: la calibración *in situ* utiliza mitocondrias permeabilizadas con tolueno. En la calibración *in vitro* rompemos las mitocondrias con Tritón X-100 y añadimos altas concentraciones de albúmina. En ambos casos, la luciferasa tiene más interacciones proteína-proteína que en una calibración normal.

### 1.11) PERMEABILIZACIÓN DE LAS MITOCONDRIAS DE LEVADURA.

Se permeabilizó la preparación de mitocondrias siguiendo los métodos ya descritos por otros grupos (Matlib et al., 1977, Thomas y Denton, 1986). La cantidad de mitocondrias deseada se resuspendió a concentraciones superiores a 20 mg/mL en tampón de homogeneización que contenía 8,5 % de polietilenglicol a 0 °C, se añadió tolueno (5 µL/mL) y la suspensión se agitó en un baño de agua/hielo. Además, cada 30 segundos se agitó suavemente en un agitador. Después de dos minutos, se centrifugó la suspensión a 14.000 x g durante 5 minutos, y la mitocondrias se lavaron y resuspendieron en el mismo medio. Se volvió a calcular la concentración de proteínas, para conocer la pérdida de proteínas mitocondriales a lo largo del proceso. Típicamente, se recuperó un 75-80 % de la proteína mitocondrial tras la permeabilización.

### 1.12) MEDIDAS DE ATP MITOCONDRIAL IN VIVO EN CÉLULAS INTACTAS.

Los ensayos con levaduras transformadas con el plásmido pYX142-Cox4-Luciferasa se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos dentro de un lector de microplacas FLUOstar Optima con agitación vigorosa. El volumen del ensayo fue de 100 µL, y se usaron  $1,5 \times 10^7$  células por pocillo. Las

células se incubaron con luciferina 0,5 mM y se observaron los cambios en luminiscencia cada 10 segundos.

Para los ensayos con células enteras desprovistas de sustratos (“ayuno”), las levaduras se preincubaron en medio MM, se transfirieron a medio rico YPD y se crecieron hasta una densidad óptica a 600 nm de 1. Después se centrifugaron, se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se transfirieron a tampón Mes/Tris 0,1 M, pH 6,5. Se mantuvieron en ese medio durante 8 horas a una dilución de  $6 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$  y se centrifugaron, se lavaron con medio Mes/Tris fresco y se resuspendieron en el mismo medio a una dilución de  $1,5 \times 10^9$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Se añadió al medio EGTA 10 mM o EGTA 10 mM y 30 mM  $\text{CaCl}_2$  para obtener un medio libre de  $\text{Ca}^{2+}$  o medio con  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente, a pH 6,5. Después de añadir luciferina y obtener una señal estable de luminiscencia se inyectó 100 mM glucosa en las muestras.

### 1.13) CINÉTICA DE GENERACIÓN DE YEMAS EN LA LEVADURA.

Las células de levadura se sembraron en medio rico YPD, y crecieron hasta fase estacionaria. Después de dos días en fase estacionaria se lavaron 3 veces con agua bidestilada y posteriormente se resuspendieron en agua bidestilada, agua bidestilada más 2 % glucosa, o agua bidestilada más 2 % glucosa y EGTA 10 mM. La densidad aproximada de células era  $2 \times 10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Permanecieron en este medio durante dos horas. Después las células fueron sedimentadas a 3000 rpm en un rotor SS34 durante 5 minutos, transferidas a medio rico YPD a la misma densidad e incubadas a 30°C. El porcentaje de células con yemas se determinó por microscopía de campo claro a distintos tiempos tras la transferencia a medio rico como describen Granot y Snyder (Granot y Snyder, 1991; Granot y Snyder, 1993).



## 2. EXPERIMENTOS CON ANIMALES

### 2.1) MANTENIMIENTO DE ANIMALES Y GENOTIPADO.

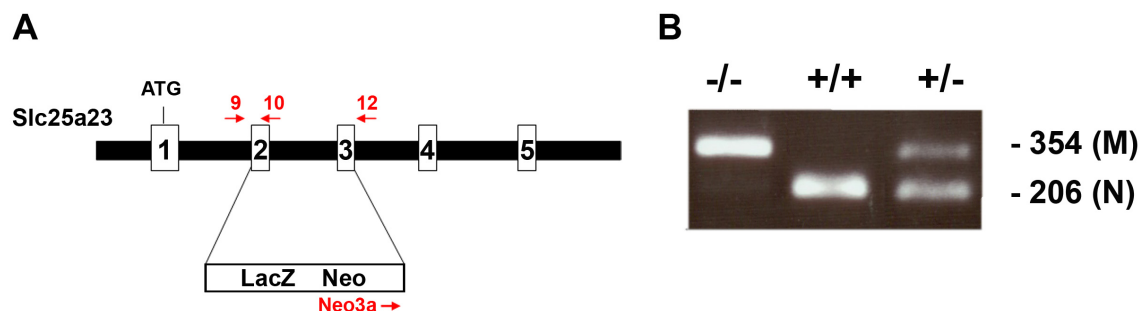
Se utilizaron ratones controles y ratones deficientes en SCaMC-3 (transportador Slc25a23). Los animales se mantuvieron en el animalario con un ciclo de luz de doce horas y comida *ad libitum*. A la edad de interés (aproximadamente 1 mes), se sacrificaron por dislocación cervical, para la extracción del tejido y posterior aislamiento de mitocondrias.

Los ratones deficientes en SCaMC-3/Slc25a23 han sido generados mediante la estrategia de recombinación homóloga por la empresa Lexicon Pharmaceuticals. Brevemente, células ES SCaMC3/Slc25a23+/-, que contienen el cassette 5'-SCaMC-3/Slc25a23+βGal+Neo en lugar de los exones 2 y 3 (figura 3.5A) se inyectaron en blastocistos, y se generaron ratones quimera con el cassette de disrupción del gen SCaMC-3 en la línea germinal. Posteriormente, se cruzaron para generar animales SCaMC-3/Slc25a23+/- . Los animales SCaMC-3/Slc25a23+/- procedentes de estos cruces se aparean para obtener los ratones SCaMC-3/Slc25a23+/+ y SCaMC-3/Slc25a23-/- utilizados en este estudio, todos ellos en el fondo genético híbrido Svj129xC57BL/6. Los ratones SCaMC-3/Slc25a23-/- son viables, fértiles y no muestran ningún cambio fenotípico aparente.

El genotipado de los ratones deficientes en SCaMC-3, se realizó aislando *DNA* genómico de muestras de cola de ratón con un kit comercial (Roche). Los ratones se identifican por el método de la doble PCR, utilizando dos parejas de oligonucleótidos que se muestran en la tabla 3.3. Los correspondientes productos de PCR para el fragmento salvaje (206 pb) y mutante (354 pb) se separan por electroforesis (figura 3.5B) en geles de agarosa al 1,5 %.

Nombre	Secuencia	Alelo que amplifica
<b>9</b> (directo)	5'-TGAGGCATGAGGCATATTCTA-3'	Normal
<b>10</b> (inverso)	5'-AAGGCTGTGAAACATGAGCA-3'	Normal
<b>Neo3a</b> (directo)	5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3'	Mutado
<b>12</b> (inverso)	5'-GGGCTAGCTGTATTACCAGTC-3'	Mutado

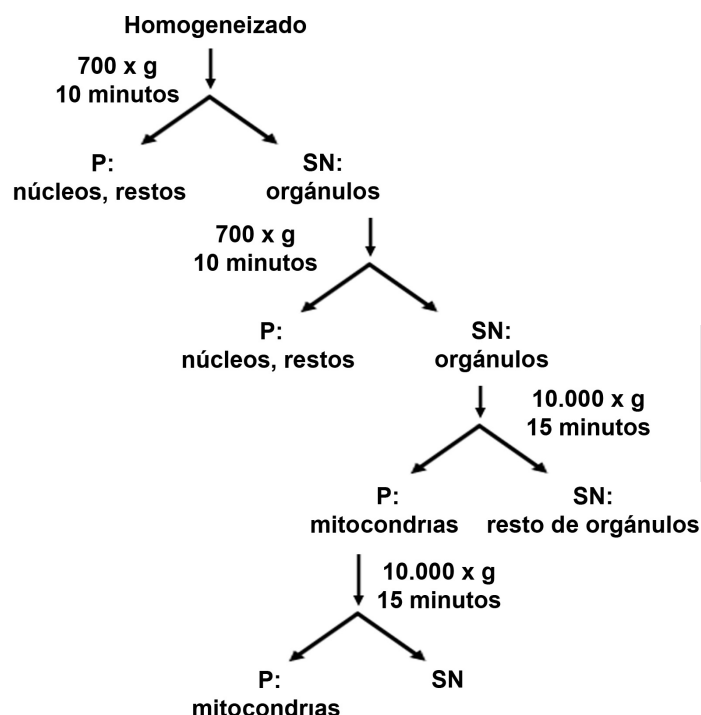
**Tabla 3.3. Oligonucleótidos empleados para genotipar los ratones.**



**Figura 3.5. Generación y genotipado de animales deficientes en ScaMC-3.** **A)** El esquema muestra el comienzo del gen ScaMC-3/Slc25a23 en ratón. El cassette que codifica para  $\beta$ Gal (LacZ) y resistencia a neomicina (Neo) sustituye los exones 2 y 3 del gen. En rojo se muestran los oligonucleótidos utilizados para genotipar los animales. Los cebadores 9 y 10 se utilizan para amplificar el gen normal, ya que el cebador 10 aparece con el exón 2. Los cebadores 12 y Neo3a se utilizan para amplificar el gen mutante, ya que Neo3a aparece dentro del cassette. **B)** Los fragmentos amplificados en la PCR se separan por electroforesis, dando lugar a una banda de 354 (alelo mutante) o de 206 (alelo normal) pares de bases.

## 2.2) AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CEREBRO E HÍGADO DE RATÓN.

Tras la extracción del tejido se procedió a lavarlo y trocearlo en medio de aislamiento (TE: sacarosa 250 mM, Hepes 25 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM,  $MgCl_2$  1,5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, iodoacetamida 1 mM, BSA 0,1 %, pH 7,4). Posteriormente el tejido se homogeneizó (utilizando un Dounce vidrio/vidrio) y se realizó una centrifugación diferencial para obtener la fracción mitocondrial. Una primera centrifugación a baja velocidad (10 minutos a 700 x g) elimina los núcleos y células enteras. El sobrenadante se centrifuga a alta velocidad (15 minutos a 10.000 x g) para obtener la fracción mitocondrial que se lava en tampón MSK (manitol 75 mM, sacarosa 25 mM, K-fosfato 5 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 0,5 mM, KCl 100 mM y BSA 0,1 %, pH 7,4) y se vuelve a centrifugar. Las mitocondrias se resuspendieron finalmente en MSK y se mantuvieron en hielo hasta su utilización. El proceso completo se detalla en la figura 3.6.



**Figura 3.6. Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de hígado y cerebro de ratón.** SN, sobrenadante, P, sedimento.

### 2.3) DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT.

Para detectar las SCaMCs en las mitocondrias de tejidos de ratón se utilizaron anticuerpos policlonales específicos para cada isoforma generados en conejo en nuestro laboratorio (del Arco y Satrústegui, 2004). El anticuerpo anti-SCaMC-1 se utilizó a dilución 1:5.000, el anticuerpo anti-SCaMC-2 a dilución 1:2.000, y el anticuerpo anti-SCaMC-3 se utilizó a dilución 1:5.000. Como anticuerpo secundario de todos ellos se utilizó el anticuerpo GarPO a una dilución 1:10.000.

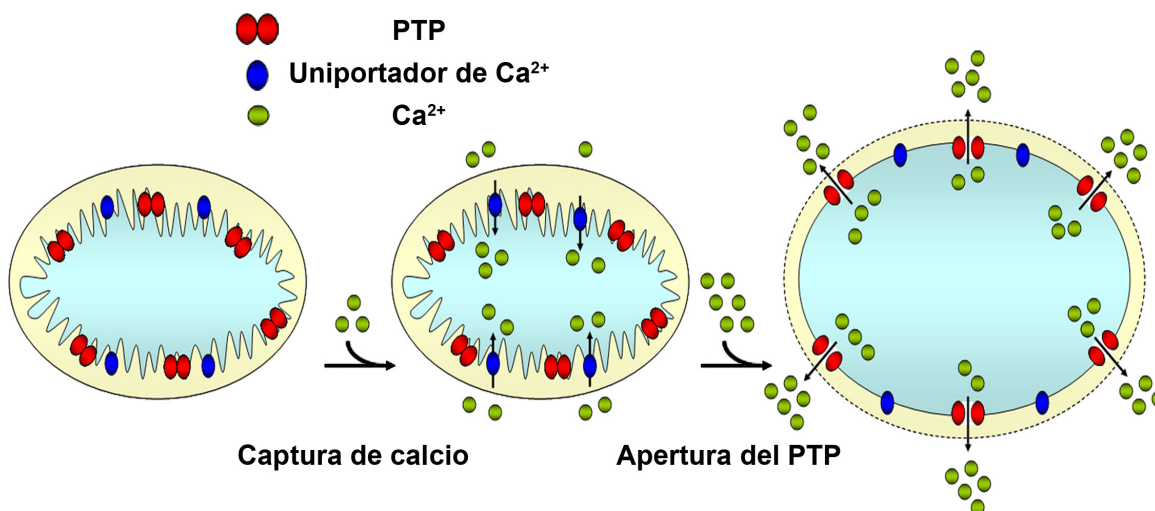
Como control de carga se utilizó un anticuerpo generado en conejo contra la proteína mitocondrial  $\beta$ -F<sub>1</sub>ATPasa (cedido generosamente por el Dr. J.M. Cuezva, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa) a dilución 1:5.000 y también un anticuerpo policlonal generado en conejo contra las proteínas VDAC (Abcam) a dilución 1:5.000. Como secundario de ambos se utilizó el anticuerpo GarPO a una dilución 1:10.000. También utilizamos como control de carga un anticuerpo monoclonal generado en ratón contra la proteína mitocondrial ciclofilina D (Mitoscience) a dilución 1:5.000. Como secundario se utilizó el anticuerpo HamPO a dilución 1:1.000.

### 2.4) MEDIDA DE LA CAPTURA DE $\text{Ca}^{2+}$ EN MITOCONDRIA AISLADA.

La captura de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió por los cambios de fluorescencia de la sonda Calcium Green-5N (0,1  $\mu\text{M}$ , excitación, 506 nm, emisión 532 nm) utilizando un fluorímetro (Aminco-Bowman Series 2 luminescence spectrometer) en medio MSK sin EDTA (manitol 75 mM, sacarosa 25 mM, K-fosfato 5 mM, Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM y BSA 0,1 %, pH 7,4) suplementado con  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Los ensayos se realizaron a 30°C con agitación en presencia de sustrato respiratorio (succinato 5 mM + rotenona 2  $\mu\text{M}$ ) y en presencia o ausencia de ATP o ADP. El ensayo comienza con la adición de mitocondrias en la cubeta (0,5 mg/mL). Tras 3-5 minutos de preincubación se realizaron adiciones repetidas de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 3.7). En algunos ensayos se utilizó rojo de rutenio (RR) 200 nM para inhibir el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaU), o ciclosporina A (CSA) 5  $\mu\text{M}$  para inhibir la apertura del PTP.

### 2.5) MEDIDA DEL HINCHAMIENTO POR APERTURA DEL PTP EN MITOCONDRIA AISLADA.

El hinchamiento (*swelling*) de las mitocondrias (figura 3.7) se monitorizó midiendo la absorbancia de la suspensión a 540 nm utilizando un espectrofotómetro provisto de control de temperatura y agitación (Thermo Electron Corporation) en medio MSK sin EDTA en presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  1 mM. Los ensayos se realizaron a 30°C con agitación en presencia de sustrato respiratorio (succinato 5 mM + rotenona 2  $\mu\text{M}$ ) y en presencia o ausencia de ATP o ADP. El ensayo comienza con la adición de mitocondrias en la cubeta (0,5 mg/mL). Tras 3-5 minutos de preincubación se añadió  $\text{Ca}^{2+}$ . En algunos ensayos se utilizó RR 200 nM para inhibir el CaU o CSA 5  $\mu\text{M}$  para inhibir la apertura del PTP.



**Figura 3.7. Captura y acumulación de calcio y apertura del PTP en mitocondrias.** Para estudiar la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura del PTP añadimos  $\text{Ca}^{2+}$  a la suspensión de mitocondrias. Las mitocondrias capturan el  $\text{Ca}^{2+}$  del medio a través del CaU, y podemos observar mediante una sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  como el Calcium Green que el  $\text{Ca}^{2+}$  externo disminuye. La acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir de un umbral provoca la apertura del PTP. En ese momento el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado y otras moléculas pequeñas se liberan a través del canal del PTP y además la mitocondria se hincha (*swelling*), ya que la osmolaridad es mayor en la matriz mitocondrial que en el medio externo. Podemos observar con una sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  que el  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio aumenta, y con un espectrofotómetro que la absorbancia de la suspensión a 540 nm disminuye.

## 2.6) TRANSPORTE DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO.

Las mitocondrias se incubaron a una concentración de 1 mg/mL en 0,5 mL de medio de ensayo (sacarosa 225 mM, K-fosfato 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, succinato 5 mM, RR 200 nM, pH 7,4). Se añadió ATP 4 mM y se incubó durante 0, 5, 7,5, 10 ó 15 minutos, a 30°C. La reacción se detuvo por dilución con 1,5 mL de medio de parada frío (el mismo que el de ensayo, pero sin succinato y con EGTA 1 mM). Las mitocondrias se centrifugaron 5 minutos a 14.000 x g en una microfuga a 4°C y se lavaron con 1,5 mL de medio de parada frío, centrifugando de nuevo como antes. Los sobrenadantes se retiraron y los sedimentos de mitocondrias se conservaron a -70°C hasta su posterior análisis.

Se prepararon extractos de perclórico de las mitocondrias (Cavero et al, 2003) que fueron utilizados para la determinación del contenido de nucleótidos de adenina (ATP y ADP), mediante la reacción de la luciferasa (Ruiz et al, 2000), para lo cual se utilizó el ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche). La quimioluminiscencia fue registrada en un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. El contenido de ATP se evaluó a partir una recta patrón preparada con diferentes cantidades de ATP. El ADP presente en los extractos se evaluó después de su conversión a ATP mediante la adición de fosfocreatina 2,5 mM y 4 unidades de creatina kinasa (Ruiz et al, 2000). El incremento en la luminiscencia obtenido bajo estas condiciones se calibró con una recta patrón preparada con diferentes cantidades de ADP.

### 3. EXPERIMENTOS CON LÍNEAS CELULARES.

#### 3.1) CULTIVO DE CÉLULAS Y TRANSFECCIONES.

Se utilizaron las líneas celulares Cos-7, células inmortalizadas de riñón de mono, y 143B, células procedentes de un osteosarcoma humano. Se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 5 % suero fetal bovino inactivado (Invitrogen) a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Para las transfecciones, las células se cultivaron en placas de 6 cm y se transfectaron con LipofectAMINA (3 µl por µg de *DNA*) (Invitrogen). Las células se incubaron con los complejos LipofectAMINA-*DNA* durante 6 horas y después el medio se reemplazó por DMEM fresco con 5 % suero fetal bovino inactivado.

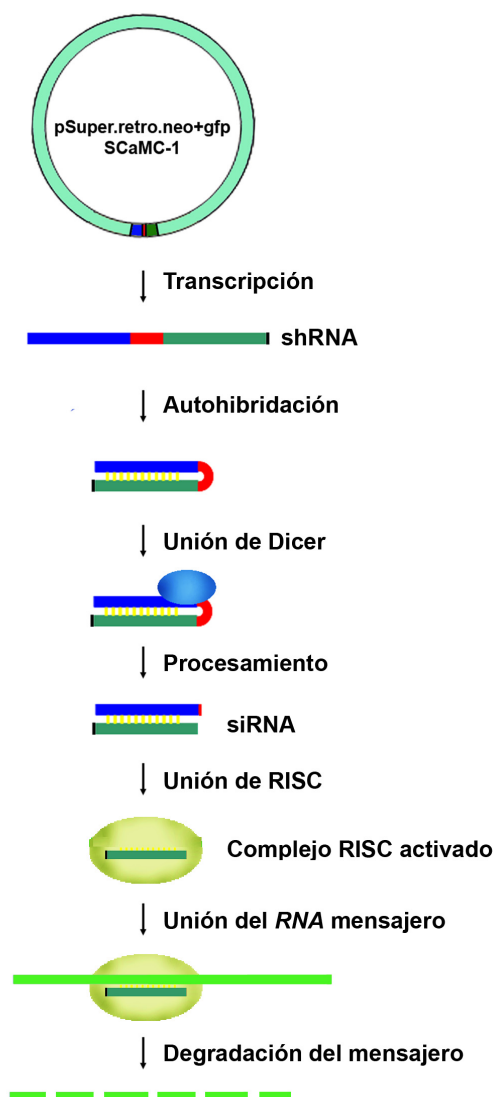
#### 3.2) ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA.

Las células se fijaron con paraformaldehído 4% (10 minutos, a temperatura ambiente) y después se lavaron en PBS. Posteriormente se procedió a permeabilizar las células con Tritón X-100 al 0,2 % en PBS durante 10 minutos y a bloquearlas en el mismo medio con BSA al 1 % durante 1 hora.

Para detectar SCaMC-1, las células se incubaron con anticuerpo primario (anti-SCaMC-1 diluido 1:400) en medio de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de varios lavados con PBS, las células se incubaron con un anticuerpo secundario generado en cabra que reconoce inmunoglobulinas de conejo acoplado a Cy3 (Jackson Immunoresearch) a dilución 1:300. Las células se lavaron 3 veces con PBS y los cubreobjetos se montaron utilizando Mowiol. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Axiovert (Carl Zeiss) con un objetivo x100.

#### 3.3) CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PARA ELIMINAR LA EXPRESIÓN DE SCaMC-1.

Para eliminar la expresión de SCaMC-1 hemos utilizado la técnica del shRNA (*small hairpin RNA*). Consiste en generar un plásmido que transcribe un fragmento de *RNA* de unas 60 bases que consta de una secuencia concreta del mensajero del gen que queremos eliminar, un corto bucle y la secuencia complementaria, de manera que dicho *RNA* se autohibrida formando *RNA* de doble cadena. En el interior de la célula este *RNA* es reconocido por la ribonucleasa DICER, que lo corta en fragmentos de *RNA* de doble cadena de 22 nucleótidos (siRNA: *small interfering RNA*). Estos siRNA se incorporan al complejo RISC. El complejo RISC se une a *RNAs* mensajeros que sean complementarios a la secuencia del siRNA y los degrada. El proceso se detalla en la figura 3.8.



**Figura 3.8. Eliminación de la expresión de SCaMC-1 mediante shRNA.** El vector pSuper.retro.neo+gfp-SCaMC-1 genera un fragmento de *RNA* que se autohibrida (shRNA). La ribonucleasa Dicer procesa dicho *RNA* y genera un *RNA* de doble cadena (siRNA). El complejo RISC toma una de las dos cadenas del siRNA y degrada todos aquellos mensajeros que son complementarios a la cadena del siRNA.

La elección de la secuencia de nucleótidos se hizo de manera empírica teniendo en cuenta los siguientes requisitos: a) que tenga entre 19 y 23 nucleótidos; b) que esté entre la base 70 después del ATG inicial y la mitad de la secuencia codificante; c) que comience por G; d) contenga alrededor de un 40-55 % de G y C. Las secuencias de nucleótidos elegidas se analizaron por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para asegurar que no muestran semejanza considerable con otros genes. Se eligieron 6 secuencias candidatas (figura 3.9), 3 de ellas específicas de humanos y otras 3 comunes con rata y ratón. Como vector de expresión se utilizó el plásmido pSuper.retro.neo+gfp (Oligoengine). Este vector presenta varias ventajas: el promotor H1 permite una alta producción del shRNA; codifica para proteína verde fluorescente (eGFP), de manera que en transfecciones transitorias se pueden visualizar las células transfectadas; y contiene las LTRs de retrovirus, de modo que puede empaquetarse en virus para mejorar la eficiencia de transfección. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, para cada secuencia elegida se generaron dos oligonucleótidos complementarios. Los oligonucleótidos directo e inverso se hibridaron y el *DNA* de doble cadena resultante se clonó en el vector pSuper.retro.neo+gfp, entre las dianas de restricción únicas BglIII y HindIII, bajo el control del promotor H1 de la *RNA* polimerasa III.



Ratón		ATGCTGCGCT
Rata		ATGCTGCGCT
Humano		ATGTTGCGCT
		*** *****
Ratón	GGCTGCGGGCCTTTGTGCTGCCACCGCCGCTGCCACGACGCGGAGCCGCCACACGCT	
Rata	GGCTGCGGGCCTTCGTGCTGCCACCGCGCTGCCAGGACGCGGAGCCGCCACGCGCT	
Humano	GGCTGCGGGACTTCGTGCTGCCACCGCGGCTGCCAGGACGCGGAGCAGCCGACGCGCT	
	***** ** ***** ***** * ***** ***** ** *	
Ratón	ACGAAACGCTCTTCCGGGCGCTGGACCGCAATGGGGACGGCGTGGTGACATCGGAGAGC	
Rata	ACGAGACGCTCTTCCGGGCGCTGGACCGCAATGGGGACGGCGTGGTGATATCGGAGAGC	
Humano	ACGAGACCCTCTTCCAAGCACTGGACCGCAATGGGACGAGTGTTGGACATCGGCGAGC	
	**** ** ***** ** ***** ***** ***** ***** *	
Ratón	TGCAGCAGGGGCTGCAAAGCCTGGGCATCCCGCTGGGCCAGGACGCGGAGGAGAAAATTT	
Rata	TGCAGCAGGGGCTGCAGAGCCTGGGCATCCCGCTGGGCCAGGCCGCCGAGGAGAAAATTT	
Humano	TGCAGGAGGGGCTCAGGAACCTGGGCATCCCTCTGGGCCAGGACGCCGAGGAGAAAATTT	
	***** ***** * ***** ***** ***** ***** *****	
Ratón	TCACCACTGGCGATGTCAACAAAGATGGGAAAGCTGGATTTGAAGAATTTATGAAATACC	
Rata	TCACCACTGGCGATGTCAACAAAGATGGGAAAGCTGGATTTGAAGAATTTATGAAATACC	
Humano	TTACTACTGGAGATGTCAACAAAGATGGGAAAGCTGGATTTGAAGAATTTATGAAGTACC	
	* ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *	
Ratón	TGAAAGACCATGAGAAGAAAATGAAATTAGCATTTAAAGTTTGGACAAGAATAATGACG	
Rata	TGAAAGACCATGAGAAGAAAATGAAATTAGCATTTAAAGTCTGGACAAGAATAATGACG	
Humano	TTAAAGACCATGAGAAGAAAATGAAGTTGGCATTTAAGAGTTTAGACAAAATAATGATG	
	* ***** ***** ** ***** ** * ***** ***** *	
Ratón	GGAAAATCGAGCCTTCTGAAATTGTCCAGTCTCTCCAGATGCTCGGTTTACATATTTCTG	
Rata	GGAAAATCGAGCCTTTTGAATCGTCCAGTCTCTCCAGATGCTGGGCTTAAATATTTCTG	
Humano	GAAAATTGAGGCTTCAGAAATTGTCCAGTCTCTCCAGACACTGGGTCTGACTATTTCTG	
	* ***** ** * ***** ***** ***** ***** ** * *****	
Ratón	AAAAGCAAGCAGAGCTGATTCTTCAAAGCATCGACTCTGATGGGACGATGACCTGGACT	
Rata	AAAAGCAAGCAGAGCTGATTCTTCAAAGCATCGACTCTGACGGGACCATGACCTGGACT	
Humano	AACAACAGCAGAGTTGATTCTTCAAAGCATTGATGTTGATGGGACAATGACATGGACT	
	** * ***** ***** ***** ** *** ***** ***** *****	
Ratón	GGAATGAATGGAGGGATTACTTTTATTTAACCTGTGACAGACATTGAGGAAATTATCC	
Rata	GGAATGAATGGAGGGATTACTTTTGTTTAACCCTGTGACAGACATTGAGGAAATTATTC	
Humano	GGAATGAATGGAGAGACTACTTCTTATTTAATCCTGTTACAGACATTGAGGAAATTATCC	
	***** ***** ** ***** ** ***** ***** ***** ***** *	
Ratón	GTTTCTGGAACACTCTACTGGAATTGACATAGGGGATAGTTAACTATTCCAGATGAAT	
Rata	GTTTCTGGAACACTCTACTGGAATTGACATAGGGGATAGTTAACTATTCCGGATGAAT	
Humano	GTTTCTGGAACATTCTCAGGAATTGACATAGGGGATAGCTTAACTATTCCAGATGAAT	
	***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	
Ratón	TCACAGAAGATGAGAAAAATCAGGACAGTGGTGGAGGCAGCTCCTGGCAGGAGGTGTGG	
Rata	TCACAGAAGATGAGAAAAATCAGGACAGTGGTGGAGGCAGCTCCTGGCAGGAGGTGTGG	
Humano	TCACGGAAGACGAAAAAATCCGGACAATGGTGGAGGCAGCTTTTGGCAGGAGGCATTG	
	**** ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** *	
Ratón	CGGGCGCGCTCTCTAGAACGAGCACCGCTCCTTTGGATCGCCTCAAGGTCATGATGCAGG	
Rata	CTGGCGCTGTCTCCAGGACAAGCACCGCTCCTTTGGATCGCCTAAAGGTCATGATGCAGG	
Humano	CTGGTGCTGTCTCTGAACAAGCACTGCCCTTTGGACCGTCTGAAAATCATGATGCAGG	
	* ** * ***** * ** ***** ** ***** ** * *****	
Ratón	TTCATGGTTCCAAATCA	
Rata	TTCACGGTTCCAAATCA	
Humano	TTCACGGTTCCAAATCA	
	**** ***** *****	

Figura 3.9. Alineamiento del RNA mensajero de SCaMC-1 en ratón, rata y humanos. La figura muestra la primera mitad de la región codificante del mensajero de SCaMC-1 a partir del ATG inicial. Los nucleótidos conservados en las tres especies se marcan con asterisco. Las 6 secuencias elegidas para generar el shRNA están recuadradas. De ellas, 3 son específicas de humano y las otras 3 son comunes a las 3 especies. La flecha roja indica la secuencia que finalmente se ha utilizado en el resto del trabajo.

La tabla 3.4 muestra los oligonucleótidos directo e inverso utilizados para generar el plásmido que finalmente hemos utilizado para disminuir la expresión de SCaMC-1. Hemos comprobado que el plásmido al que dan lugar funciona en transfecciones transitorias y estables (ver resultados). Los otros 5 plásmidos han tenido una eficiencia menor o su generación y/o secuenciación presentaba dificultades técnicas.

Nombre	Secuencia
SCaMC-11 (directo)	5'- <u>gatcccc</u> GAGGAAATTATCCGTTTCTGG <b>TTCAAGAGA</b> ccagaaacggataatttcctc <b>TTTTTA</b> -3'
SCaMC-12 (inverso)	5'- <u>agctt</u> aaaaaGAGGAAATTATCCGTTTCTGG <b>TCTCTTGAA</b> ccagaaacggataatttcctc <b>GGG</b> -3'

**Tabla 3.4. Oligonucleótidos utilizados para generar el vector pSuper.retro.neo+gfp-SCaMC-1.** El oligonucleótido directo consta una secuencia BglII (subrayada), seguida de la secuencia de SCaMC-1 elegida, un bucle (en negrita), la secuencia complementaria (en minúscula) y una cola (en negrita). El oligonucleótido inverso consta de una secuencia HindIII (subrayada), seguida de la secuencia complementaria al oligonucleótido directo, incluido el bucle (en negrita), y finalmente una cola (en negrita).

### 3.4) MEDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS INTACTAS.

Para medir el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo se utilizó la sonda lipofílica fluorescente TMRM (500 nM) que se acumula en la mitocondria de acuerdo con el potencial de membrana. Las células se incubaron en TMRM durante 10 minutos, y la fluorescencia roja se midió con el citómetro de flujo. El protonóforo FCCP (15  $\mu$ M) se utilizó para disipar el gradiente de protones y sirvió como control de pérdida de potencial de membrana.

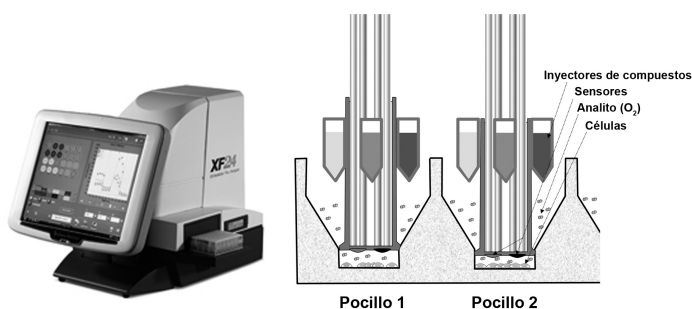
Para medir el potencial de membrana mitocondrial por microscopía confocal en los ensayos de PTP *in vivo* las células se preincubaron con 100 nM TMRM durante 20 minutos a 37 °C en tampón Krebs-Ringer modificado (KRB; NaCl 135 mM, KCl 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, glucosa 5,5 mM, Hepes 20 mM, pH 7,4). Se tomaron imágenes de microscopía confocal utilizando un equipo Zeiss 510 CLSM equipado con un sistema de detención META y un objetivo x40.

### 3.5) MEDIDA DE LA RESPIRACIÓN EN CÉLULAS INTACTAS.

La respiración se midió a 37 °C utilizando un equipo XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, figura 3.10), cuyo uso ya ha sido descrito (Wu et al., 2007). Las células se sembraron en DMEM con suero a una densidad de 10.000-20.000 células por pocillo en placas especiales de 24 pocillos (Seahorse Bioscience) y se las dejó toda la noche en el incubador a 37 °C y a 5 % CO<sub>2</sub>. Al día siguiente se lavaron e incubaron durante 1 hora a 37 °C en 700  $\mu$ l de medio de ensayo (DMEM sin bicarbonato sódico suplementado con 5 % suero fetal bovino inactivado). Después del proceso de calibrado del XF24 (30 minutos), la placa de células y el cartucho de medida, que contiene sensores



(de pH y oxígeno) e inyectores para los inhibidores y desacoplantes, se cargaron en el aparato. Los ciclos de medida constaron de 1 minuto de mezcla, 2 minutos de espera y 3 minutos de medida.



**Figura 3.10. Esquema del funcionamiento del XF24.**

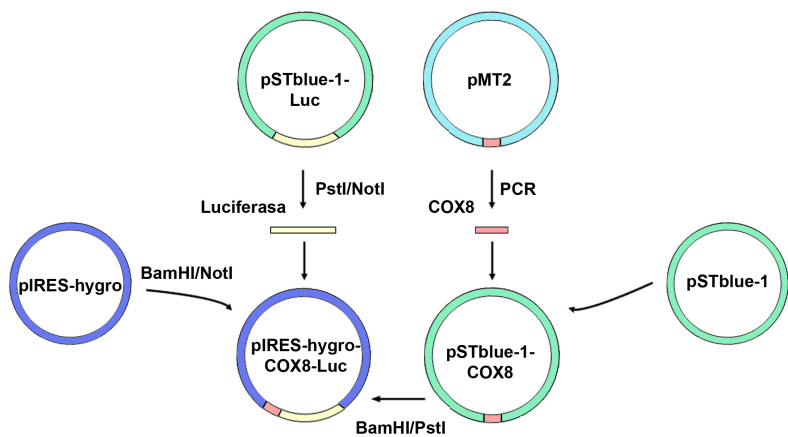
### 3.6) MEDIDA DE LOS NIVELES DE CALCIO EN CÉLULAS UTILIZANDO AEQUORINA.

Para medir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en células vivas se ha utilizado la sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  luminiscente aequorina, a partir de vectores que dirigen su expresión a la mitocondria o al citosol (Chiesa et al., 2001). Las células se transfectaron transitoriamente con un plásmido que codifica para una aequorina citosólica o mitocondrial (Chiesa et al., 2001) y se analizaron 24 horas después. Se incubaron con coelenterazina 5  $\mu\text{M}$ , coenzima de la aequorina, durante 2 horas en medio KRB modificado a 37  $^{\circ}\text{C}$  y después se transfirieron a una cámara de perfusión. Todos los ensayos se realizaron en KRB modificado, que contiene  $\text{CaCl}_2$  1 mM. Posteriormente se añadió histamina (100  $\mu\text{M}$ ) o ATP (100  $\mu\text{M}$ ) para estimular las células. Para finalizar el experimento se perfundió la cámara con una solución que contenía digitonina 100  $\mu\text{M}$  para lisar las células y  $\text{CaCl}_2$  10 mM para descargar completamente la aequorina. La señal de luz se recogió por medio de un luminómetro y se transformó en  $[\text{Ca}^{2+}]$  como se ha descrito previamente (Chiesa et al., 2001).

### 3.7) GENERACIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DE LA LUCIFERASA MITOCONDRIAL.

Para generar la luciferasa mitocondrial, la secuencia codificante de la luciferasa se fusionó en fase con la secuencia codificante de la señal de localización mitocondrial de la proteína COX8. La presecuencia de COX8 ha sido usada previamente para dirigir proteínas a la matriz mitocondrial de células de mamífero (Jouaville et al., 1999). La secuencia codificante de la luciferasa se obtuvo del vector pSTBlue-1-Luc (ver apartado 1.3), utilizando las enzimas de restricción PstI y NotI (figura 3.11).

Los primeros 125 nucleótidos de COX8 se amplificaron por PCR a partir del plásmido pMT2 (proporcionado por el Dr. Rosario Rizzuto) utilizando los oligonucleótidos Cox81 y Cox82 (tabla 3.5). El fragmento obtenido se clonó en el plásmido pSTBlue-1. La construcción de fusión se clonó en el vector pIRES-hygro por medio de las enzimas BamHI y NotI (figura 3.11).



**Figura 3.11. Generación del plásmido de expresión de la luciferasa mitocondrial.** La secuencia de la luciferasa se obtuvo del plásmido pSTBlue-1-Luc, mientras que la presecuencia de COX8 se obtuvo por PCR a partir del plásmido pMT2.

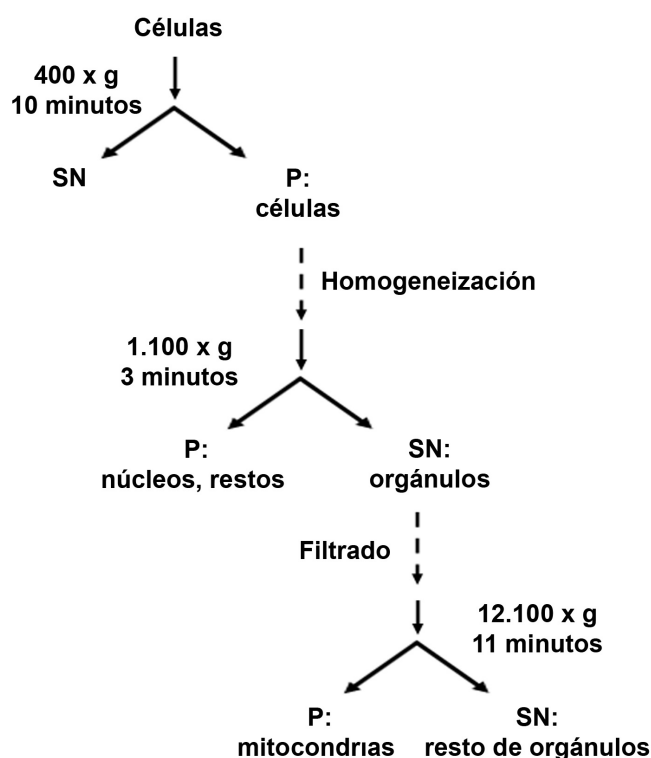
Nombre	Secuencia	Adiciones
<b>Cox81</b> (directo)	5'-aaggatccGTACTCCGTGCCATC <b>ATG</b> TC-3'	diana BamHI; codón de iniciación (en negrita)
<b>Cox82</b> (inverso)	5'-aactgcagCCCCTCCGGCGGCAACGAA-3'	diana PstI

Tabla 3.5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar COX8.

3.8) AISLAMIENTO DE MITOCONDRIAS DE CÉLULAS EN CULTIVO.

Las células se lavaron dos veces en tampon de homogeneización IM (sacarosa 250 mM, Hepes 20 mM, EGTA 2 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, y BSA 0,1 %, pH 7,4), se recolectaron de las placas de cultivo utilizando un rascador de células y se sedimentaron (350 x g durante 10 minutos). Posteriormente se homogeneizaron (utilizando un Dounce vidrio/vidrio) en tampón de homogeneización suplementado con inhibidores de proteasas (1 mM PMSF, 1 mM iodoacetamida) y los núcleos y restos celulares se eliminaron tras centrifugar durante 3 minutos a 1.100 x g. La fracción mitocondrial se filtró a través de una doble capa de muselina, se sedimentó (11 minutos, 12.100 x g), se resuspendió en tampón MSK y se mantuvo en hielo hasta su uso. El proceso de aislamiento completo se muestra en la figura 3.13. En general, partiendo de 7 placas de 145 cm<sup>2</sup> crecidas a confluencia se obtuvo alrededor de 1,5 mg de proteína mitocondrial.

En estas mitocondrias se analizó la apertura del PTP como ya se ha descrito para mitocondrias de cerebro e hígado.



**Figura 3.12.** Esquema del procedimiento de purificación de mitocondrias de células en cultivo. SN, sobrenadante, P, sedimento.

### 3.9) MEDIDA DE ATP EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE LÍNEAS CELULARES.

Se aislaron mitocondrias de células transfectadas de forma estable con el plásmido pIRES-hygro-Cox8-Luc. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos dentro de un lector de microplacas FLUOstar OPTIMA. El volumen del ensayo fue de 100  $\mu\text{L}$ , a una concentración de proteínas de 0,5 mg/mL en medio MSK sin EDTA suplementado con succinato 5 mM (y rotenona 2  $\mu\text{M}$ ) como fuente respiratoria,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, RR 200 nM y diferentes concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre a 30 °C con agitación. Se inyectó en las muestras D-luciferina 0,2 mM justo antes de empezar a medir la luz. Después de obtener una señal estable se inyectó ATP o ADP y se observaron los cambios en luminiscencia cada 10 segundos.



## Resultados

---



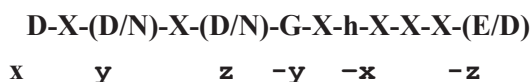
## RESULTADOS

### 1. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi EN LEVADURAS, SAL1p.

#### 1.1) CARACTERÍSTICAS Y EXPRESIÓN DE LA SCaMC EN LEVADURA.

La proteína Sal1p es el único representante de la familia SCaMC en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Codifica para una proteína de 545 aminoácidos que se localiza en la mitocondria (Cavero et al., 2005) y que presenta, como todos los CaMC, un dominio N-terminal con motivos de unión a calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de tipo *EF-hand*.

La figura 4.1 muestra un alineamiento de la secuencia de Sal1p con las SCaMC humanas, la proteína de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulina y el transportador Aac2p. Sal1p carece de dos de los cuatro motivos *EF-hand* canónicos de las SCaMCs (Cavero et al., 2005), ya que los motivos EF 1 y 4 contienen cada uno dos aminoácidos que no se ajustan a la secuencia consenso típica del motivo:



donde *X* es cualquier aminoácido y *h* es un aminoácido hidrofóbico. Los puntos clave de la secuencia consenso son las posiciones x, y, z, -z.

Los motivos EF2 y 3 sí son canónicos, y Chen demostró que son fundamentales para la función de Sal1p (Chen, 2004). Sal1p presenta otra modificación adicional, que es una inserción de 40 aminoácidos entre los motivos EF3 y EF4.

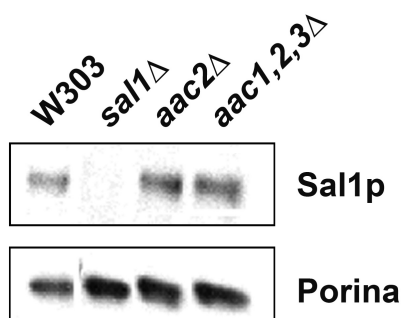
Todas estas características estructurales de la secuencia de Sal1p pueden tener sus consecuencias en cuanto a la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  de la proteína, comparada con las de humanos y con la calmodulina.

El mutante de disrupción de *sal1Δ* carece del transportador, como puede verse en la figura 4.2, y no presenta defectos de crecimiento ni en fuentes de carbono fermentables ni en no fermentables (Cavero et al., 2005). Por el contrario, Sal1p está presente tanto en mitocondrias de levaduras *wild type* (W303) como en mitocondrias de las cepas que carecen de transportadores de ADP/ATP (AACs), *aac2Δ* y *aac1,2,3Δ* (figura 4.2) La expresión de Sal1p es idéntica tanto en fuentes de carbono fermentables como no fermentables (Kucejova et al., 2008 y resultados no mostrados).

[illegible]



**Figura 4.1. Alineamiento de las SCaMCs humanas y de levadura, calmodulina y el transportador de ADP/ATP, Aac2p.** Se muestran los 4 motivos EF (EF1-EF4) del dominio N-terminal y se marcan las posiciones clave (x, y, z, -y, -x, -z). Los residuos no canónicos se marcan en rojo. En SCaMC-2a y SCaMC-2c el EF1 no tiene ningún residuo canónico (recuadro rojo). Los motivos EF van precedidos y seguidos de una  $\alpha$ -hélice (H). Están ausentes en SCaMC-3L y Aac2p. También se muestran las hélices transmembrana del dominio C-terminal (TM1-TM6). Los residuos implicados en la unión al sustrato se muestran en azul (puntos de contacto I, II y III, en hélices 2, 4 y 6), mientras que los residuos implicados en la formación de las redes de puentes salinos se muestran en verde (hélices 1, 3 y 5: red mitocondrial; hélices 2, 4 y 6: red citosólica).

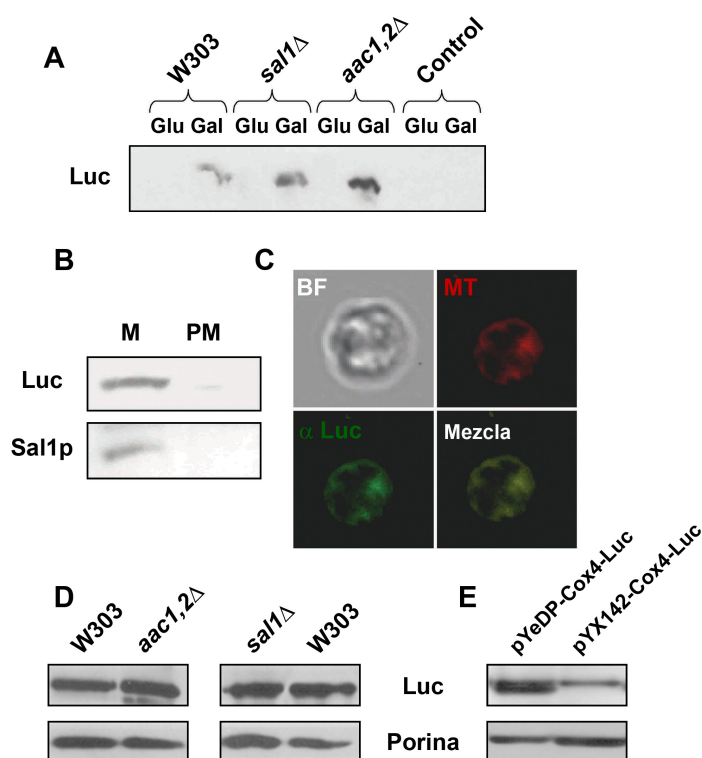


**Figura 4.2. El mutante *sal1Δ* carece de la expresión de Sal1p.** Análisis por western blot de la expresión de Sal1p en mitocondrias (10  $\mu$ g de proteína por pocillo) aisladas de células de cepa W303, *sal1Δ*, *aac2Δ* y *aac1,2,3Δ*. Como control de cargase utilizó Porina.

## 1.2) EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA LUCIFERASA.

Para estudiar la actividad de los transportadores de ATP-Mg/Pi y de otros transportadores de nucleótidos en levadura hemos desarrollado un método de medida de ATP basado en la enzima luciferasa. Varias cepas de levaduras se transformaron con los plásmidos pYeDP-Cox4-Luc y pYX142-Cox-Luc. La expresión de la luciferasa se analizó en los transformantes por western blot y por inmunofluorescencia.

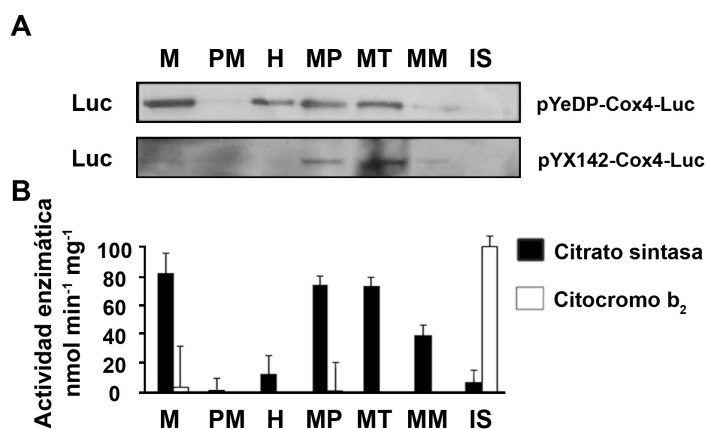
Como puede verse en la figura 4.3A, las levaduras transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc, de expresión inducible regulada por galactosa, muestran expresión de luciferasa sólo cuando el medio de cultivo lleva galactosa como fuente de carbono, pero no cuando lleva glucosa. Un posterior subfraccionamiento celular mostró que la luciferasa se encuentra en la fracción mitocondrial, pero no en el sobrenadante postmitocondrial (figura 4.3B). La localización mitocondrial también se confirmó en ensayos de inmunofluorescencia, comprobando que el marcaje de la proteína con anticuerpos específicos coincidía con el marcaje de la sonda fluorescente mitocondrial Mitotracker (figura 4.3C). Los niveles de la enzima son idénticos en distintas cepas de levadura analizadas (figura 4.3D). La mitocondria se dividió a su vez en dos fracciones, mitoplasto y espacio intermembrana, y el mitoplasto finalmente en matriz mitocondrial y membranas mitocondriales. La luciferasa se localiza concretamente en la matriz mitocondrial, pero nunca en el espacio intermembrana (figura 4.4).



**Figura 4.3. Expresión de la luciferasa.**

**A)** Western Blot de extractos totales de células W303, *sal1Δ* y *aac1,2Δ* transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc y células W303 no transformadas (control) durante el crecimiento en YPD (Glu) o YPGR (Gal). Se utilizó el anticuerpo contra la luciferasa. **B)** Western blot contra la luciferasa de fracciones subcelulares (5  $\mu$ g por pocillo) de células W303 crecidas en YPGR. Se utilizó Sal1p como marcador mitocondrial. M: mitocondria; PM: sobrenadante postmitocondrial. **C)** Inmunofluorescencia de células W303 crecidas en YPGR. Se utilizó MitoTracker Red para localizar las mitocondrias (MT), y anticuerpos contra luciferasa ( $\alpha$ -Luc). BF: campo claro. **D)** Comparación de la niveles de luciferasa en mitocondrias (5  $\mu$ g) de células W303, *sal1Δ* y *aac1,2Δ* transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc durante el crecimiento en YPGR. Se utilizó Porina como control de carga. **E)** Comparación de los niveles de luciferasa en mitocondrias (30  $\mu$ g) de células W303 transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc o pYX142-Cox4-Luc durante el crecimiento en YPGR y YPD respectivamente.

Cuando se utilizó el plásmido pYX142-Cox-Luc, de expresión constitutiva, también se pudo comprobar que la localización de la luciferasa era idéntica, en la matriz mitocondrial. Sin embargo, los niveles de proteína obtenidos son inferiores (unas diez veces) a los obtenidos con el plásmido regulable por galactosa (figuras 4.3E y 4.4).



**Figura 4.4. Localización de la luciferasa en la matriz mitocondrial.**

**A)** Western blot contra la luciferasa de fracciones subcelulares y submitocondriales (5  $\mu$ g por pocillo) de células W303 transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc (panel superior) o pYX142-Cox4-Luc (panel inferior) durante el crecimiento en YPGR y YPD respectivamente. **B)** Se midió la actividad del citocromo b<sub>2</sub> (barras blancas) y de la citrato sintasa (barras negras) como marcadores del espacio intermembrana y de la matriz mitocondrial respectivamente en las mismas fracciones M: mitocondria; PM: sobrenadante postmitocondrial; H: homogenado celular total; MP: mitoplasto; MT: matriz mitocondrial; MM: membranas mitocondriales; IS: espacio intermembrana. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes.

### 1.3) CALIBRACIÓN DE LA LUCIFERASA MITOCONDRIAL.

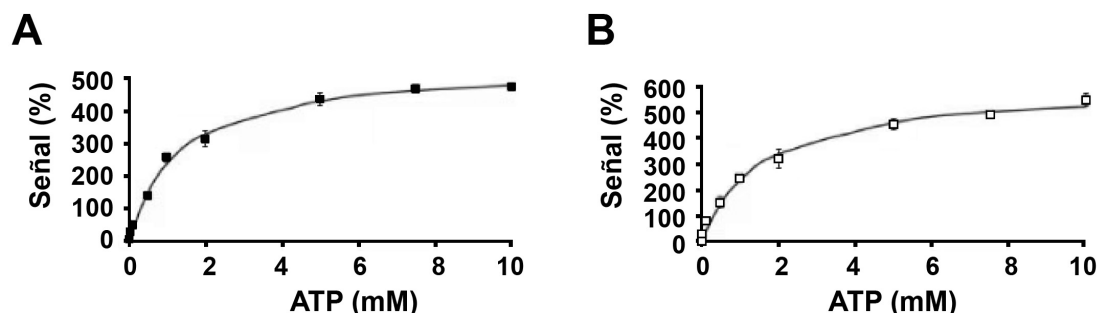
La luciferasa de *Photinus pyralis* tiene una afinidad relativamente alta por ATP. La  $K_m$  para ATP es menor de 0,5 mM (Zako et al., 2003), una concentración inferior a la que se cree que existe en mitocondrias sanas, lo que podría comprometer su uso como sonda de ATP mitocondrial.

Sin embargo, bastantes grupos la han empleado para este fin utilizando células transfectadas o microinyecciones de la proteína, y han descubierto que dentro de las células la luciferasa responde a niveles de ATP de hasta 10 mM (Allue et al., 1996; Maechler et al., 1998; Kennedy et al., 1999). Parece claro, por tanto, que el comportamiento de la luciferasa *in vitro* es distinto de su comportamiento *in vivo*. La causa puede estar en las interacciones proteína-proteína entre la enzima y las proteínas citosólicas o mitocondriales, como ya se ha descrito (Allue et al., 1996).

Se han utilizado dos métodos para calibrar la luciferasa. Por un lado, una calibración *in situ*, utilizando mitocondrias permeabilizadas con tolueno (Matlib et al., 1977; Thomas y Denton, 1986), y por otro, una calibración *in vitro*, utilizando mitocondrias solubilizadas en presencia de altas concentraciones de albumina, un método ya utilizado para mimetizar las proteínas intracelulares (Allue et al., 1996). La enzima es extremadamente sensible a pequeños cambios en pH (Koop y Cobbold, 1993), por tanto todos los reactivos que se añadieron a la reacción, como el ATP, estaban debidamente tamponados.

Para construir las curvas de dependencia de sustrato de la luciferasa, y utilizarlas para transformar los valores de luminiscencia de los experimentos en niveles de ATP hemos obtenido previamente por extracción en perclórico el contenido inicial de ATP en mitocondrias de levadura, que es  $0,250 \pm 0,038$  nmoles por mg proteína (media  $\pm$  SEM de 8 determinaciones independientes). Asumiendo que el volumen mitocondrial es 0,7  $\mu$ l por miligramo de proteína (Koehler et al., 2000), la concentración de ATP en la mitocondria aislada es aproximadamente 0,35 mM. En la curvas de la figura 4.5 al valor de ATP de 0,35 mM le hemos asignado un valor de luminiscencia de 100%, y a partir de ahí se ha generado el resto de la curva de calibración.

Siguiendo ese método se han obtenido las calibraciones que se muestran en la figura 4.5. Como puede verse, el comportamiento de la luciferasa con ambos sistemas es idéntico, con un valor de  $K_m$  para ATP de alrededor de 1,5 mM, similar a la obtenida por otros grupos en luciferasas intracelulares (Allue et al., 1996; Maechler et al., 1998; Kennedy et al., 1999). Sin embargo, la  $K_m$  para el ATP de la luciferasa soluble fue  $0,4 \pm 0,1$  mM (media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes), similar a la encontrada en la literatura (Zako et al., 2003). Por tanto, las propiedades cinéticas de la luciferasa mitocondrial parecen adecuadas para su uso como sonda de los niveles de ATP.



**Figura 4.5. Calibración de la luciferasa recombinante.** Calibración *in vitro* (A) e *in situ* (B) de la luciferasa mitocondrial. En A la  $K_m$  para ATP es  $1,43 \pm 0,16$  mM (media  $\pm$  SEM de 9 experimentos). En B la  $K_m$  para ATP es  $1,61 \pm 0,23$  mM (media  $\pm$  SEM de 3 experimentos). Los datos se ajustaron por regresión no lineal utilizando el SigmaPlot v.9 (Jaendell Scientific).

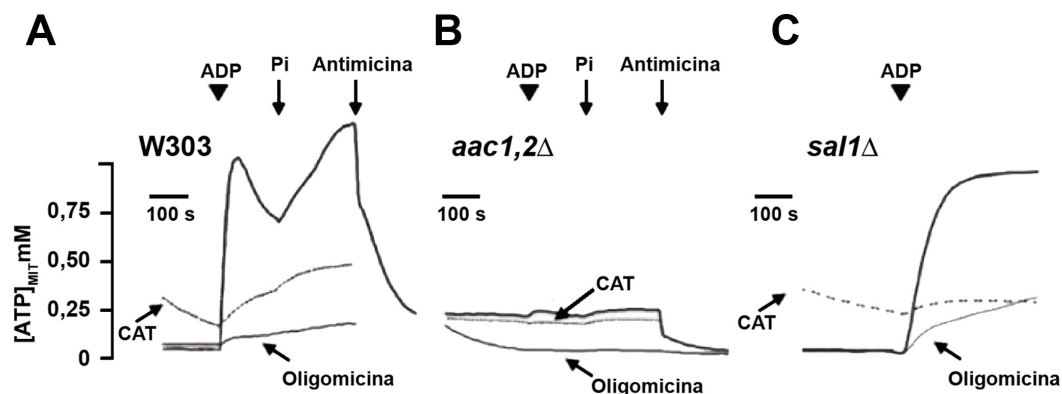
#### 1.4) LA LUCIFERASA MITOCONDRIAL ES CAPAZ DE MEDIR LA SÍNTESIS DE ATP POR FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN MITOCONDRIA AISLADA.

En mitocondrias aisladas que utilizan succinato y etanol como sustratos respiratorios, la adición de ADP 0,5 mM en un medio con  $\text{Ca}^{2+}$  libre bajo ( $0,5 \mu\text{M}$ ) es seguida de un incremento rápido de los niveles de ATP mitocondrial (figura 4.6A). Dicho aumento de ATP es bloqueado por oligomicina ( $12,5 \mu\text{g/mL}$ ), un inhibidor de la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa, lo que indica que el ADP es transportado a la matriz mitocondrial y transformado en ATP. Si añadimos fosfato (1 mM) se estimula la producción de ATP mitocondrial. La presencia de carboxiatractilósido (CAT,  $20 \mu\text{M}$ ), que inhibe al AAC, y por tanto la entrada del ADP, bloquea casi por completo el aumento de ATP mitocondrial. Además, la presencia de CAT provoca un aumento de los niveles iniciales de ATP mitocondrial, lo que sugiere que incluso en ausencia de ADP externo, algo de ATP escapa de las mitocondrias a través del AAC.-

Mitocondrias de la cepa *sal1Δ* se comportan de la misma manera (figura 4.6C). Sin embargo, en mitocondrias de la cepa *aac1,2Δ*, que carecen de las isoformas 1 y 2 del AAC, la adición de ADP no produce síntesis de ATP (figura 4.6B). Además, la adición de CAT no provoca ningún efecto en la producción de ATP o en los niveles iniciales de ATP. Estos experimentos demuestran que las mitocondrias de esta cepa no contienen ningún AAC funcional, lo que concuerda con que la tercera isoforma *AAC3* no se expresa en estas condiciones, sino en anaerobiosis (Drgon et al., 1991).

La adición de antimicina A ( $1 \mu\text{M}$ ), un inhibidor del complejo III, o la adición de un desacoplante, como el FCCP ( $10 \mu\text{M}$ ) provocan la pérdida de ATP en las mitocondrias de todas las cepas, mientras que la rotenona ( $2 \mu\text{M}$ ), un inhibidor del complejo I, ausente en *S. cerevisiae*, no provoca ningún efecto (figura 4.6A y B y resultados no mostrados).

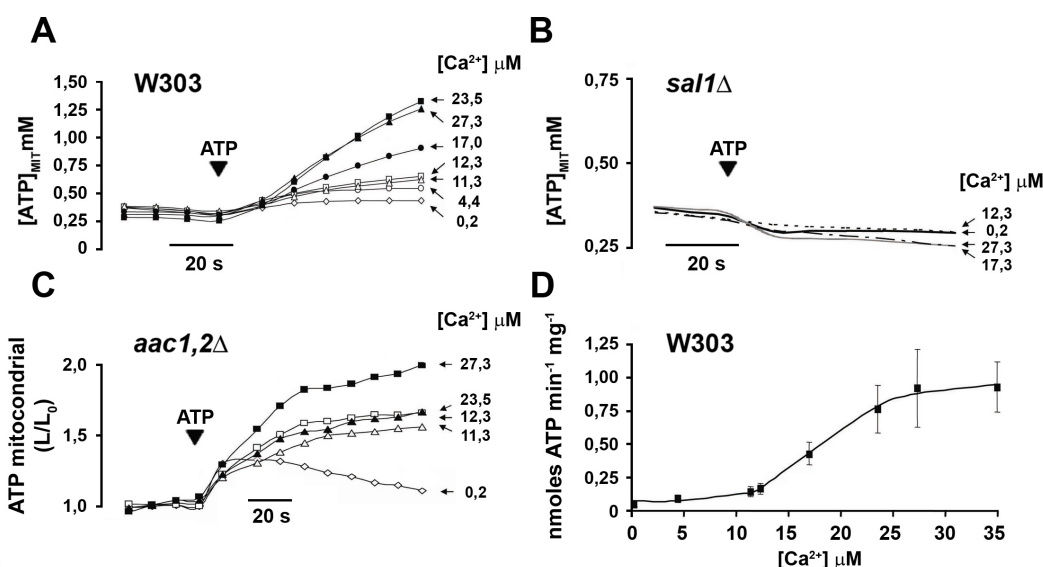
Todos estos resultados muestran que la luciferasa puede ser utilizada como reportero molecular de los niveles de ATP mitocondrial.



**Figura 4.6. Niveles de ATP durante la fosforilación oxidativa.** Mitocondrias de células W303 (A), *aac1,2Δ* (B) y *sal1Δ* (C) transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc se incubaron con etanol 1 % y succinato 5 mM como sustratos respiratorios, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 1mM (Ca<sup>2+</sup> libre ≈ 0,5 μM) y luciferina 0,1 mM en presencia o ausencia de CAT 20 μM u oligomicina 12,5 μg/mL. La luminiscencia se midió cada 10 segundos y se transformó en concentración de ATP utilizando las curvas de calibración de la figura 4.5. La punta de flecha indica la adición de ADP 0,5 mM. En A y B se añadió Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 mM (Pi) y antimicina A 1 μM donde se indica.

### 1.5) Sal1p ES UN TRANSPORTADOR DE ATP Y SU ACTIVIDAD DEPENDE DE Ca<sup>2+</sup>.

Mitocondrias de células W303 incubadas con CAT (20 μM) muestran una actividad transportadora de ATP después de la adición de ATP al medio de ensayo. El transporte de ATP es activado por Ca<sup>2+</sup> externo en el rango micromolar (figura 4.7A y D). Por debajo de Ca<sup>2+</sup> libre 1 μM el transporte es nulo, y se satura a partir de Ca<sup>2+</sup> libre 25 μM. La S<sub>0,5</sub> para Ca<sup>2+</sup> es 15,0 ± 1,1 μM (media ± SEM de 5 experimentos independientes).

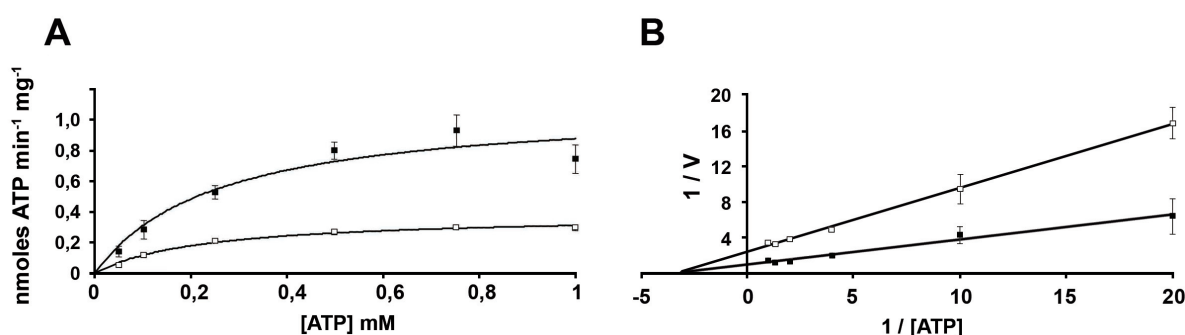


**Figura 4.7. Sal1p transporta ATP y es activado por calcio.** Mitocondrias de células W303 (A,D), *sal1Δ* (B) y *aac1,2Δ* (C) transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc se incubaron con succinato 5 mM como sustrato respiratorio, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y luciferina 0,1 mM en presencia de CAT 20 μM y las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> libre indicadas. La luminiscencia se midió cada 10 segundos y se transformó en concentración de ATP utilizando las curvas de calibración de la figura 4.5. La punta de flecha indica la adición de ATP 2,5 mM. En C la concentración de ATP se expresa como la señal de luz (L) dividida por la señal inicial (L<sub>0</sub>). Se muestra un experimento representativo de cada cepa. D) Activación por Ca<sup>2+</sup> del transporte de ATP en la cepa W303. La velocidad se calculó a partir de la pendiente después de la adición de ATP y se ajustó utilizando el Sigma Plot v.9 (R<sup>2</sup>>0.99) a la ecuación:  $V = V_0 + [(V_{max} - V_0) \times [Ca^{2+}]^N] / (S_{0,5}^N + [Ca^{2+}]^N)$  (donde V<sub>0</sub> es la velocidad con Ca<sup>2+</sup> libre ≈ 0, V<sub>max</sub> es la actividad máxima, N es el índice de Hill y S<sub>0,5</sub> es la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre que genera la mitad de la actividad máxima).

Las mitocondrias de la cepa *aac1,2Δ* también poseen esa actividad insensible a CAT y estimulable por  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 4.7C). Por tanto, dicha actividad no depende de los AACs. Sin embargo, las mitocondrias aisladas de levaduras que carecen de Aac2p son de baja calidad, como ya observo Kolarov (Drgon et al., 1991). Esto es lógico, ya que Aac2p es la proteína más abundante en la membrana mitocondrial interna. La señal de luz en estas mitocondrias muestra más oscilaciones y picos inespecíficos que en las mitocondrias de la cepa W303. Por esa razón, en el resto de ensayos se utilizaron exclusivamente mitocondrias aisladas de cepas con Aac2p.

Sorprendentemente, las mitocondrias de la cepa *sal1Δ* no acumulan ATP de manera significativa en presencia de CAT, a cualquier concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (figura 4.7B). Estos datos demuestran que Sal1p es responsable de este transporte de ATP insensible a CAT.

La  $K_m$  para la captura de ATP insensible a CAT en mitocondrias de células W303 es 200  $\mu\text{M}$  (figura 4.8), y no se ve modificada por  $\text{Ca}^{2+}$ . Sin embargo, la  $V_{\max}$  cambió de  $0,38 \pm 0,02$  a  $1,14 \pm 0,10$   $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  al modificar el  $\text{Ca}^{2+}$  libre de 10 a 20  $\mu\text{M}$ . Por tanto, el  $\text{Ca}^{2+}$  incrementa la  $V_{\max}$  del transportador sin modificar la  $K_m$ . La  $K_m$  para ATP es similar a la obtenida por el grupo de Palmieri para los ortólogos humanos, SCaMC-1 y SCaMC-3, en proteoliposomas (Fiermonte et al., 2004). Por otro lado, la  $K_m$  es muy inferior a la obtenida por el grupo de Aprille en mitocondrias de hígado de rata (Aprille, 1988, 1993), que esta en torno a 1-2 mM.



**Figura 4.8. Constantes cinéticas de Sal1p.** Mitocondrias de células W303 transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc se incubaron con succinato y CAT como se ha indicado en la figura 4.7 y se ensayó el transporte de diferentes concentraciones de ATP a 10 ó 20  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  libre (símbolos abiertos y cerrados respectivamente). **A)** Los datos se ajustaron utilizando el Sigma Plot v.9 a la ecuación:  $V = (V_{\max} \times [\text{ATP}]) / (K_m + [\text{ATP}])$  (donde  $V_{\max}$  es la actividad máxima y  $K_m$  es la concentración de ATP que genera la mitad de la actividad máxima. La  $K_m$ , alrededor de 200  $\mu\text{M}$ , es similar a ambas concentraciones de calcio. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. **B)** Representación de inversos. Los datos se ajustan perfectamente a dos rectas que se cortan en el eje de las X ( $-1/K_m$ ), pero tienen distinto corte en el eje de las Y ( $1/V_{\max}$ ).

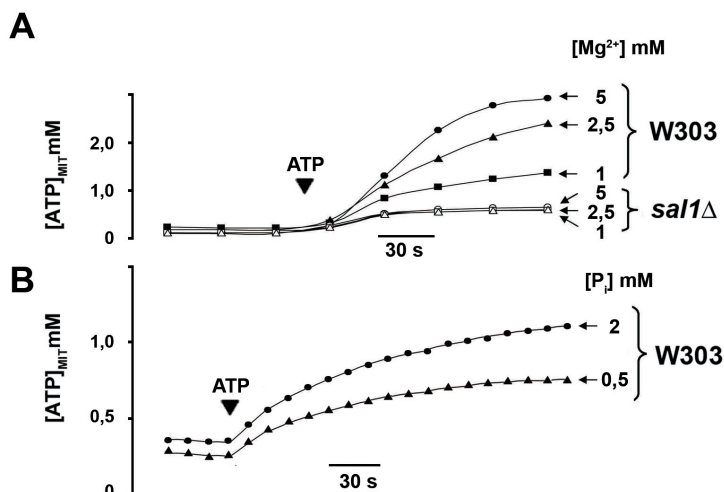
#### 1.6) EL TRANSPORTE DE ATP DEPENDE DE MAGNESIO Y FOSFATO.

El transporte de ATP a través del transportador de ATP-Mg/Pi de hígado depende de  $\text{Mg}^{2+}$ , siendo el ATP-Mg el complejo transportado (Aprille, 1988, 1993; Joyal y Aprille, 1992; Fiermonte et al., 2004; Cavero et al., 2005). Para caracterizar la dependencia de  $\text{Mg}^{2+}$  de Sal1p con la luciferasa mitocondrial, una enzima que utiliza ATP-Mg como sustrato, las mitocondrias se preincubaron con  $\text{MgCl}_2$  10 mM durante 5 minutos a 30°C para llenarlas de  $\text{Mg}^{2+}$ , presumiblemente a través de Mrs2p, el canal mitocondria de  $\text{Mg}^{2+}$  (Kolisek et al., 2003). Posteriormente se lavaron y resuspendieron en



un medio con la concentración deseada de  $Mg^{2+}$  y ATP. Esta preincubación no cambió el contenido o razón de nucleótidos de adenina (resultados no mostrados).

Al reducir la concentración de  $Mg^{2+}$  de 5 a 2,5 ó 1 mM, la velocidad de entrada de ATP cayó un  $41 \pm 9 \%$  o un  $66 \pm 5 \%$ , respectivamente (media  $\pm$  SEM de 5 experimentos) en mitocondrias de células W303, pero no en mitocondrias sin Sal1p (figura 4.9A). El transporte de ATP también se ve inhibido si se utiliza EDTA para quelar el  $Mg^{2+}$  del medio (inhibición de un  $37 \pm 9 \%$  en presencia de EDTA 3 mM, media  $\pm$  SEM de dos experimentos realizados por triplicado).



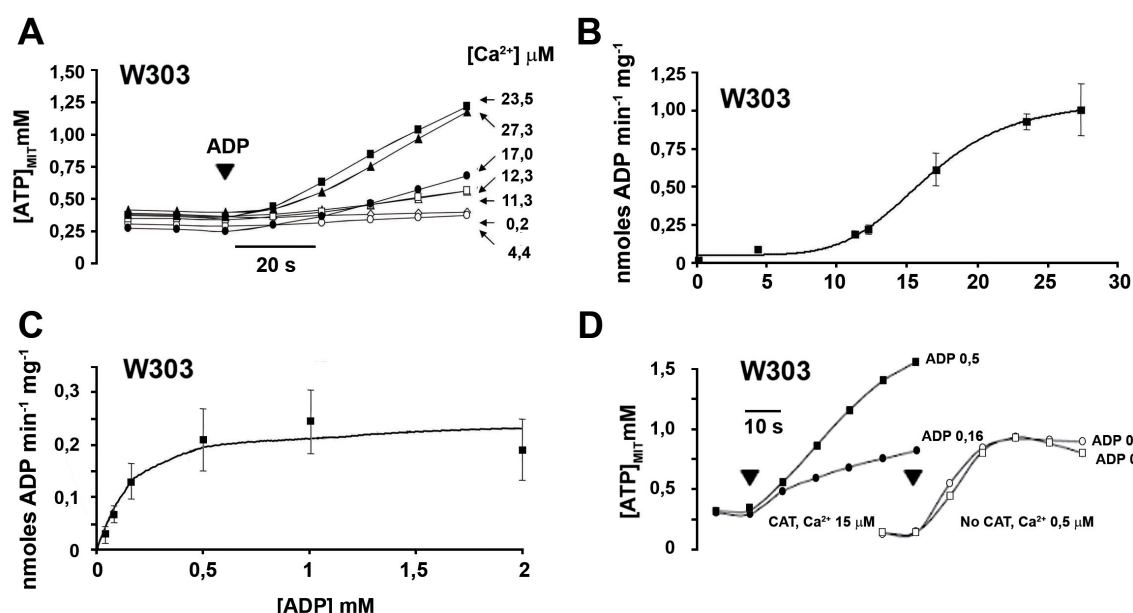
**Figura 4.9. Efectos del  $Mg^{2+}$  y  $P_i$  en el transporte de ATP a través de Sal1p.** Mitocondrias de células W303 y *sal1Δ* transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc se incubaron con succinato y CAT como se ha indicado en la figura 4.7 y se ensayó el transporte de ATP 2,5 mM a distintas concentraciones de  $MgCl_2$  (A) y  $Na_2HPO_4$  (B). El  $Ca^{2+}$  libre era 15  $\mu M$  aproximadamente. La luminiscencia se transformó en concentración de ATP utilizando las curvas de calibración de la figura 4.5. Los datos corresponden a un experimento representativo.

El transportador de ATP-Mg/ $P_i$  de hígado de rata intercambia ATP-Mg $^{2+}$  externo por fosfato divalente interno ( $HPO_4^{2-}$ ). El grupo de Aprille (Aprille, 1988, 1993) demostró que el transporte de ATP es inhibido parcialmente si el medio de reacción carece de fosfato. Esto se debe a que la concentración de fosfato en la matriz mitocondrial depende de su concentración externa, ya que el fosfato entra en la matriz a través de su propio transportador dependiente de  $\Delta pH$  (Guerin et al., 1990). En mitocondria de levadura, si disminuimos la concentración externa de fosfato (y por tanto también la interna, que es la que se intercambia por ATP) el transporte de ATP a través de Sal1p disminuye (figura 4.9B), aunque el efecto es relativamente pequeño (una disminución del 19 % al cambiar la concentración de fosfato de 2 a 0,5 mM).

#### 1.7) EL ADP TAMBIÉN ES SUSTRATO DE Sal1p, PERO EL TRANSPORTE DE ADP NO DEPENDE DE MAGNESIO.

El transportador hepático de ATP-Mg/ $P_i$  transporta ADP además de ATP (Aprille, 1988, 1993; Joyal y Aprille, 1992; Fiermonte et al., 2004). Las mitocondrias de maíz también muestran transporte de ADP seguido de fosforilación a ATP sensible a oligomicina en presencia de CAT (Abou-Khalil y Hanson, 1979), un proceso llevado a cabo posiblemente por el transportador de ATP-Mg/ $P_i$ . Para estudiar el transporte de ADP a través de Sal1p, las mitocondrias de células W303 se incubaron con ADP en presencia de CAT, y los cambios en los niveles de ATP mitocondrial obtenidos en esas condiciones se atribuyeron a la fosforilación del ADP por la  $H^+$ -ATP sintasa. La figura 4.10A

muestra los cambios en los niveles de ATP, que se impidieron en presencia de oligomicina, inhibidor de la  $H^+$ -ATP sintasa (resultados no mostrados). El  $Ca^{2+}$  externo activó el transporte de ADP en el mismo rango que activa el transporte de ATP ( $S_{0,5}$  para  $Ca^{2+} = 17,4 \pm 0,7 \mu M$ , media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes, figura 4.10B). La  $V_{max}$  también era similar a la obtenida con ATP-Mg,  $1,06 \pm 0,12 \text{ nmol ADP min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ . Por el contrario, mitocondrias de la cepa *sal1Δ* no muestran transporte de ADP en presencia de CAT a ninguna concentración de  $Ca^{2+}$  (resultados no mostrados). La  $K_m$  para ADP era  $280 \mu M$  (figura 4.10C), ligeramente superior a la  $K_m$  para ATP-Mg, y similar a la de las isoformas humanas SCaMC-1 y SCaMC-3 (Fiermonte et al., 2004). Este valor de  $K_m$  es mucho mayor que la  $K_m$  para ADP del transportador de ADP/ATP mayoritario en levaduras, Aac2p ( $K_m \approx 2 \mu M$ , De Marcos Lousa et al., 2002), cuya actividad era igual a 0,16 y 0,5 mM ADP mientras que la de Sal1p aumentó aproximadamente 2 veces en ese rango de concentración (figura 4.10D).

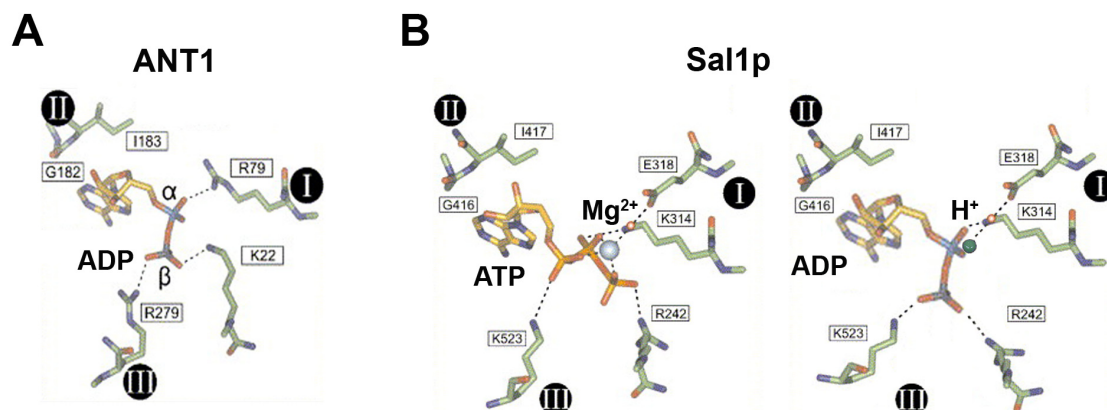


**Figura 4.10. Sal1p también transporta ADP y es activado por calcio.** A) Mitocondrias de células W303 transformadas con el plásmido pYEDP-Cox4-Luc se incubaron con succinato y CAT y las concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre indicadas como se ha indicado en la figura 4.7. La adición de 0,5 mM ADP se indica con la punta de flecha. B) Activación por  $Ca^{2+}$  del transporte de ADP en la cepa W303. La velocidad se calculó a partir de la pendiente después de la adición de ADP y se ajustó utilizando el Sigma Plot v.9 a la misma ecuación que en la figura 4.7D. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. C) Se ensayó el transporte de diferentes concentraciones de ADP en presencia de CAT a 15  $\mu M$   $Ca^{2+}$  libre. Los datos se ajustaron a la misma ecuación que en la figura 4.8A. D) La afinidad por ADP de Sal1p y Aac2p es muy diferente. Hemos utilizado condiciones que activan Sal1p e inhiben Aac2p (CAT y  $Ca^{2+}$  libre 15  $\mu M$ ) o que activan Aac2p e inhiben Sal1p (ausencia de CAT, ausencia de  $Ca^{2+}$ ). Se puede ver que el transporte de ADP a través de Sal1p aumenta cuando aumentamos la concentración de ADP de 0,16 mM a 0,5 mM, mientras que el transporte a través de Aac2p no se ve alterado, ya que está saturado.

Para comprobar si el transporte de ADP requiere  $Mg^{2+}$ , se añadió EDTA 3 mM al medio de reacción para quelar parcialmente el  $Mg^{2+}$  presente. Esto produjo la inhibición del transporte de ATP (ver más arriba), pero no de ADP (cambio de  $0,2 \pm 13 \%$ , media  $\pm$  SEM de 2 experimentos realizados por triplicado). Este resultado está de acuerdo con los datos obtenidos en mitocondrias de hígado de rata (Aprille, 1988, 1993), con los datos obtenidos en proteoliposomas con las isoformas humanas SCaMC-1 y -3 (Fiermonte et al., 2004), y con la conclusión de que el ADP es intercambiado con



$\text{HPO}_4^{2-}$  como  $\text{HADP}^{2-}$  (Aprille, 1988, 1993; Joyal y Aprille, 1992). El aminoácido E318 del punto de unión al sustrato (I) de Sal1p (Robinson y Kunji, 2006), que se piensa que está implicado en la unión del  $\text{Mg}^{2+}$  del complejo  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ , podría ser responsable de la unión del protón que acompaña al ADP en el  $\text{HADP}^{2-}$  (figura 4.11).



**Figura 4.11. Comparación del sitio de unión con el sustrato de los AAC y Sal1p.** A) Sitio de unión del ADP al transportador de ADP/ATP de mamíferos ANT1. El grupo adenina se une al punto de contacto II (GI), mientras que los grupos fosfato cargados negativamente se unen a residuos cargados positivamente en los puntos de contacto I y III (lisinas y argininas). B) Sitio de unión de Sal1p. El punto de contacto II es idéntico y une la adenina del mismo modo que ANT1. Sin embargo, el punto de contacto I contiene un residuo cargado negativamente (E318), que provocaría repulsión de los fosfatos del ADP o ATP. El  $\text{Mg}^{2+}$  en el ATP o el  $\text{H}^+$  en el ADP podrían unirse a ese residuo apantallando su carga negativa, y por tanto, los cationes serían fundamentales para el transporte. Por esa razón el ATP solo no es transportado por Sal1p, ni las SCAmCs humanas. Modificado de Kunji y Robinson, 2006.

Resultados

### 1.8) Sal1p Y AACs COMO SISTEMAS DE IMPORTE DE ATP EN MITOCONDRIAS DE LEVADURA.

La mitocondria de levadura intercambia ADP citosólico por ATP mitocondrial a través del AAC cuando respira. Queríamos comprobar si el AAC también puede funcionar al revés y contribuir al importe de ATP a la mitocondria, incluso cuando la mitocondria respira utilizando succinato como sustrato. Hemos estudiado el transporte de ATP en mitocondria aislada en condiciones permisivas para el AAC pero no para Sal1p (ausencia de CAT y de  $\text{Ca}^{2+}$ ) o condiciones permisivas para Sal1p, pero no para el AAC (presencia de CAT y de  $\text{Ca}^{2+}$ ).

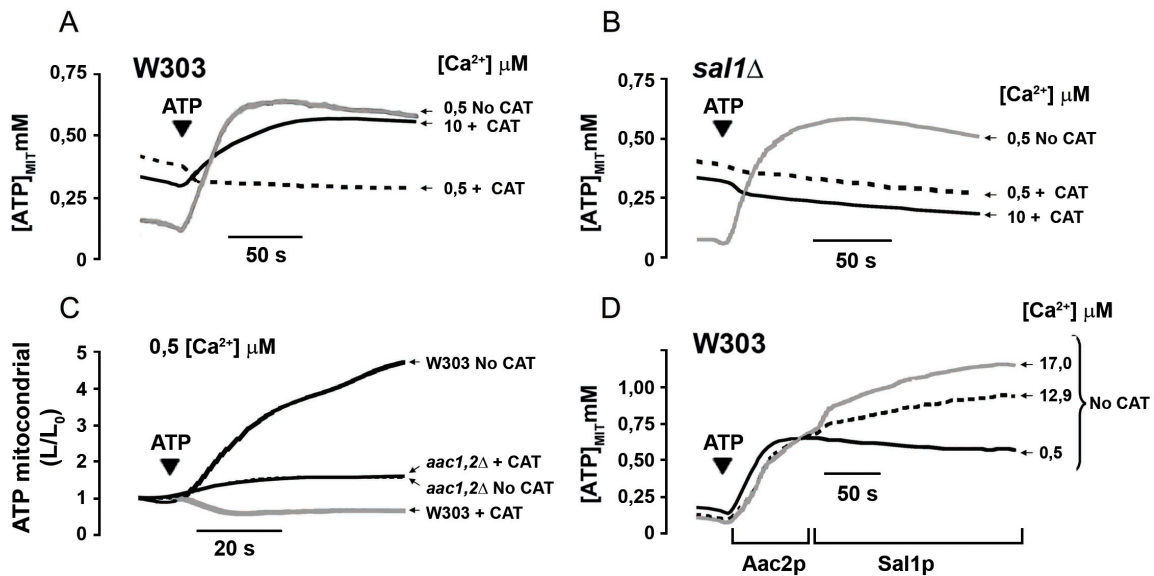
Con un potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) de -140 a -160 mV (Prieto et al., 1995; Castrejón et al., 1997; Kolisek et al., 2003), y las concentraciones internas de ATP y ADP medidas en ausencia de CAT (alrededor de 0,28 y 1 mM respectivamente), la presencia de 1 mM ATP en un medio libre de ADP (asumiendo una contaminación de ADP de 1  $\mu\text{M}$ ) proporciona una fuerza de entrada ( $\Delta G$ ) de alrededor de -5 a -7 kJ/mol, según la fórmula que se detalla a continuación, lo que permite la entrada de ATP a la mitocondria a través del AAC:

$$\Delta G = (n_{\text{ATP}} - n_{\text{ADP}})F\Delta\Psi + RT[L_n([ATP]_{\text{mit}}/[ATP]_{\text{cito}}) - L_n([ADP]_{\text{mit}}/[ADP]_{\text{cito}})]$$

donde  $n$  es la carga (-4 para ATP, -3 para ADP),  $\Delta\Psi$  se expresa en voltios,  $F$  es la constante de Faraday (96,48  $\text{Kj V}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ),  $R$  es la constante universal de los gases ideales (0,00831  $\text{Kj mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ) y  $T$  es la temperatura (303 °K)

La figura 4.12A muestra que en mitocondrias de la cepa W303, utilizando succinato como sustrato y en presencia de EGTA 1 mM ( $\text{Ca}^{2+}$  libre externo  $\approx 0,5 \mu\text{M}$ , que no activa a Sal1p), hay una captura muy rápida de ATP que no se observa en mitocondrias tratadas con CAT. Esta entrada de ATP también se puede observar en mitocondrias *sal1Δ* (figura 4.12B), y es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en las concentraciones que activan a Sal1p (resultados no mostrados). Sin embargo, no se observa en mitocondrias de la cepa *aac1,2Δ* a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 4.12C).

Los resultados siguientes (no mostrados) descartan que los cambios observados en luminiscencia



**Figura 4.12. Transporte de ATP a través de los AACs y Sal1p.** Mitocondrias de células W303 (A, C y D), *sal1Δ* (B) y *aac1,2Δ* (C) transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc se incubaron con succinato 5 mM como sustrato respiratorio,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM y luciferina 0,1 mM en presencia o ausencia de CAT 20  $\mu\text{M}$ . En C la concentración de ATP se expresa como la señal de luz (L) dividida por la señal inicial ( $L_0$ ). Se muestra un experimento representativo de cada cepa. Se utilizó 20  $\mu\text{M}$  CAT y  $\text{Ca}^{2+}$  libre 10  $\mu\text{M}$  para activar específicamente Sal1p e inhibir las AACs; ausencia de CAT y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar específicamente las AACs e inhibir Sal1p; CAT y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  para bloquear ambos transportadores; y finalmente ausencia de CAT y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre indicadas en D para activar ambos transportadores.

se deban a transporte de ADP contaminante y posterior fosforilación a ATP dentro de la mitocondria: 1) el incremento en ATP mitocondrial tras la adición de ATP externo se inhibió sólo parcialmente por oligomicina, que bloquea completamente la fosforilación del ADP. 2) la presencia de antimicina A, que impide generar un  $\Delta\Psi$  estimuló la captura de ATP, pero no la de ADP. 3) La captura de ATP fue, al contrario que la captura y fosforilación de ADP, insensible a los niveles de  $\text{Mg}^{2+}$  o fosfato del medio.

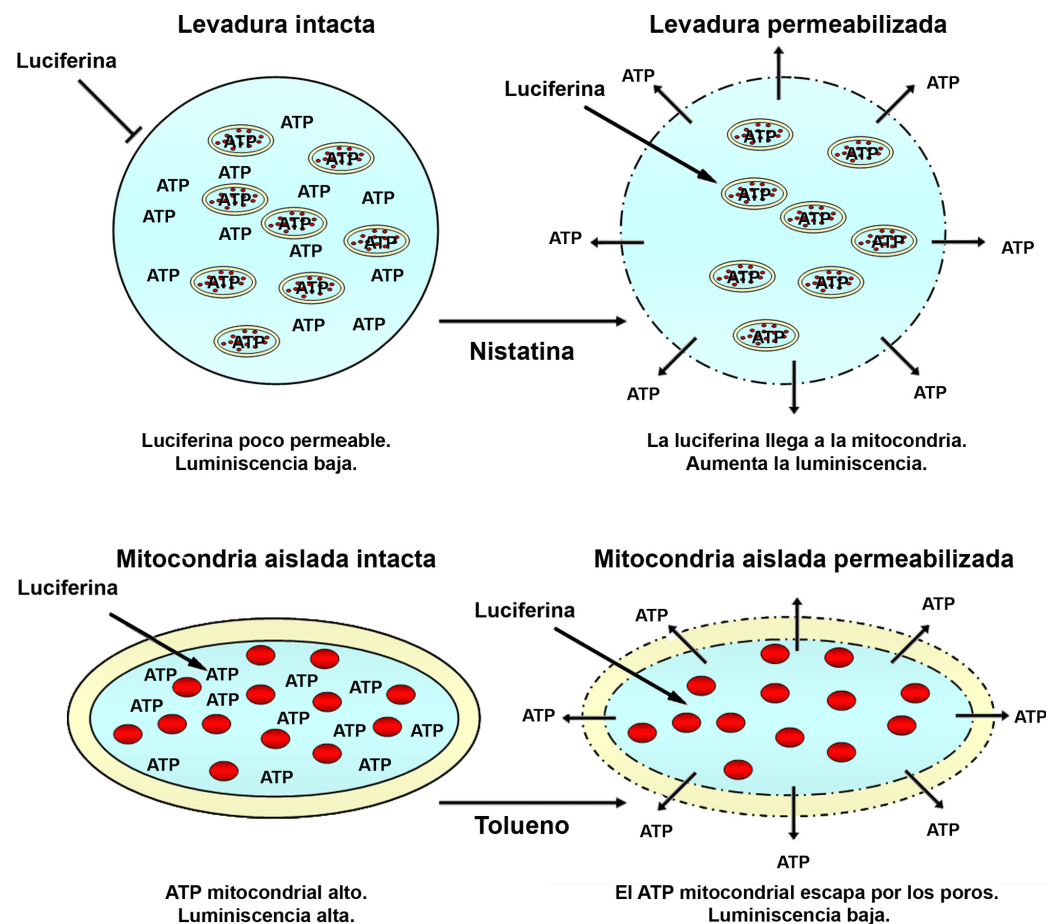
La contribución de Aac2p y Sal1p al transporte de ATP en mitocondrias W303 incubadas en condiciones permisivas para ambos transportadores (con  $\text{Ca}^{2+}$  y en ausencia de CAT) se muestra en la figura 4.12D. Tras la adición de ATP se produce un aumento rápido en los niveles de ATP mitocondrial que es insensible a  $\text{Ca}^{2+}$ , seguido de un aumento más lento, que es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestros datos indican que la primera captura rápida es debida a Aac2p funcionando en reverso (o intercambiando ATP con otro anión, como por ejemplo, pirofosfato (PPi), ya que los AACs también realizan este intercambio (Aprille, 1988)) y la segunda captura, más lenta, es debida a Sal1p.

### 1.9) LAS SEÑALES DE CALCIO INDUCIDAS POR GLUCOSA ACTIVAN Sal1p *IN VIVO*.

La glucosa actúa como hormona en las células de levadura y su señalización utiliza una cascada en la que el AMP cíclico (AMPC) y el  $\text{Ca}^{2+}$  son segundos mensajeros (Rolland et al., 2002). A diferencia de las células de mamífero, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  requiere la entrada del ion desde el medio externo (Tökés-Füzesi et al., 2002). Sin embargo, aparte de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática (Trópia et al., 2006), no se conocen las dianas de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glucosa. La presencia de motivos EF en Sal1p indica que podría ser una de esas dianas. Sin embargo, la activación por  $\text{Ca}^{2+}$  de Sal1p sólo parece imprescindible en ausencia de AACs (Chen, 2004; Cavero et al., 2005). Habiendo demostrado que ambas pueden transportar ATP a la mitocondria, hemos estudiado el papel de cada una en la señalización por glucosa.

Para estudiar los niveles de ATP mitocondrial *in vivo* hemos utilizado células W303 y *sal1Δ* que expresan constitutivamente la luciferasa mitocondrial desde el vector pYX142-Cox4-Luc. La cantidad de luciferasa expresada con este plásmido es alrededor de diez veces menor que desde el plásmido pYeDP-Cox4-Luc (figura 4.3E). Las células muestran un máximo de luminiscencia unos 20 minutos después de la adición de luciferina, y después se produce una caída muy lenta. La señal inicial de luz en células enteras es varios órdenes de magnitud más pequeña que la de mitocondrias aisladas, ya que la luciferina debe atravesar la membrana plasmática y la membrana mitocondrial interna. Este efecto ya se observó previamente en células que expresaban una luciferasa peroxisomal (Leskinen et al., 2003). Como consecuencia de ello, la señal de luminiscencia muestra más ruido que la de mitocondrias aisladas. También se observa un nivel bajo de luminiscencia en células enteras transformadas con el plásmido pYeDP-Cox4-Luc, por lo que el alto ruido no se debe a los niveles de expresión bajos en el plásmido pYX142-Cox4-Luc, sino a la permeabilidad de la luciferina a través de las dos membranas.

Para confirmar que la luciferasa está indicando los niveles de ATP mitocondrial y no los citosólicos también en la célula entera, permeabilizamos las células utilizando nistatina (Sigma) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 10 minutos a 30 °C (Averet et al., 1998). La señal de luz aumentó más de diez veces después de la permeabilización (figura 4.13), lo que sugiere que ahora la luciferina cruza rápidamente la membrana plasmática a través de los poros y está más disponible para la luciferasa. Si la luciferasa fuera citosólica, se esperaría observar una gran disminución de luminiscencia después de la permeabilización, ya que el ATP se escaparía por los poros. Cuando permeabilizamos las mitocondrias con tolueno observamos precisamente eso, que se pierde la luminiscencia basal, al perderse el ATP mitocondrial (figura 4.13). Por otra parte, también hemos añadido  $\text{PPi}$  2 mM a las células permeabilizadas. El  $\text{PPi}$  se intercambia con nucleótidos de adenina a través del AAC (Aprille, 1988), y podemos observar como se pierde la luminiscencia, al perderse el ATP mitocondrial (resultados no mostrados).



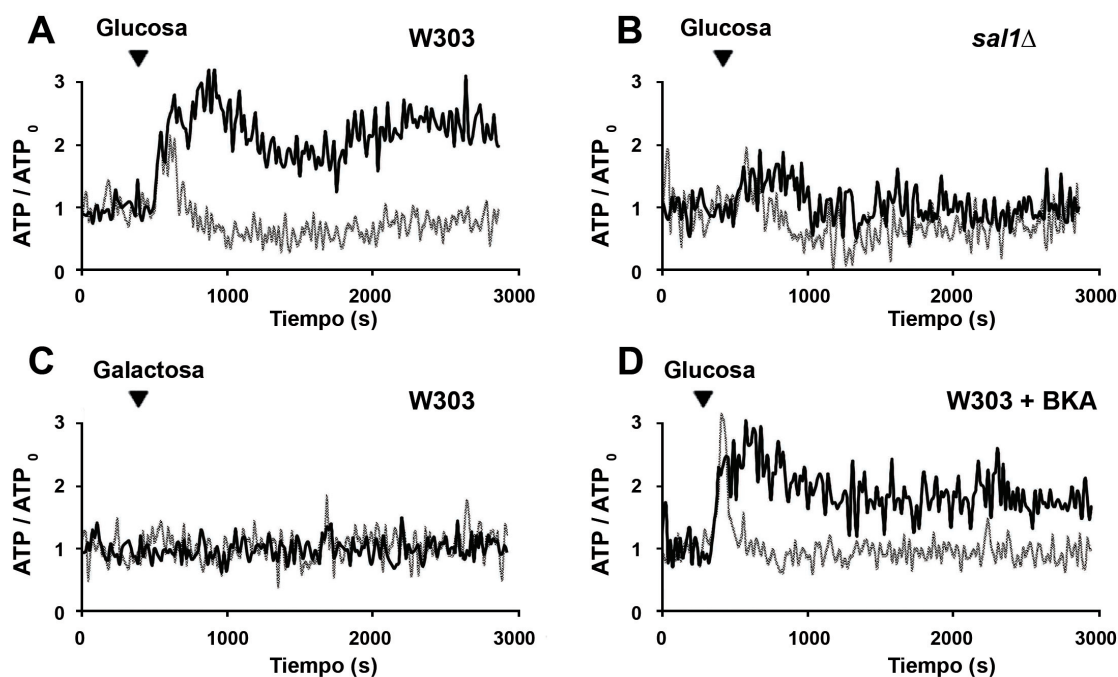
**Figura 4.13. Diferencias en el comportamiento de células y mitocondrias permeabilizadas.** En la célula entera de levadura la luciferina debe atravesar dos membranas (plasmática y mitocondrial interna) para llegar hasta la luciferasa. Por tanto, la luminiscencia es muy baja. Cuando permeabilizamos la célula utilizando nistatina, la luciferina llega más fácilmente a la mitocondria, el ATP del citosol se escapa por los poros, pero el mitocondrial permanece en la mitocondria, y la señal de luz aumenta. En la mitocondria aislada la luciferina sólo tiene que atravesar una membrana y la señal de luminiscencia es alta. Cuando permeabilizamos la mitocondria con tolueno el ATP mitocondrial escapa de la matriz, y la señal de luz disminuye.

Las células de levadura sufren caídas grandes en sus niveles de ATP, aumentos en ADP y especialmente AMP, cuando se les retira la glucosa (Wilson et al., 1996; Osorio et al., 2005). La readición de glucosa provoca una disminución inmediata de la razón ATP/ADP debido a las reacciones consumidoras de ATP de la glucólisis, seguida por un incremento progresivo de la razón ATP/ADP en los siguientes minutos (Theobald et al., 1993, Wilson et al., 1996). La adición de glucosa 100 mM a células ayunadas de nutrientes produjo un incremento en los niveles de ATP mitocondrial que alcanzó el máximo unos 200-250 segundos después del estímulo (incremento del  $85 \pm 15$  % en el intervalo de 900-1000 segundos, media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes, figura 4.14A, línea negra). La exposición a EGTA 10 mM, que reduce al rango submicromolar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, inhibió el incremento en ATP mitocondrial inducido por glucosa (figura 4.14A, línea gris). Estos datos sugieren que la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el exterior inducida por glucosa, que alcanza su máximo en unos 200 segundos (Tisi et al., 2002), es responsable de ese aumento en ATP mitocondrial. De hecho, la adición de galactosa, que no es metabolizada en levaduras ayunadas

para glucosa y no estimula la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trópia et al., 2006), no provoca ningún cambio en los niveles de ATP mitocondrial (figura 4.14C).

Para probar los efectos del inhibidor permeable del AAC, ácido bongkreico (BKA, Calbiochem) se modificó el pH del ensayo a 4,5, ya que el inhibidor sólo es permeable a pH ácido. A este pH la luciferina no está cargada, ya que se protoniza en un grupo carboxilo. Por tanto es más permeable a la membrana plasmática y se ven niveles mayores de luminiscencia, como ya habían observado otros autores (Leskinen et al., 2003). La adición de BKA 50  $\mu\text{M}$  provocó una disminución gradual en los niveles de ATP mitocondrial (resultados no mostrados). Esto indica que se requiere la actividad del AAC para mantener la producción de ATP mitocondrial en células en ayuno. Sin embargo, las células tratadas con el inhibidor siguen respondiendo a glucosa de forma similar a células control (figura 4.14D). Este experimento demuestra que el incremento en ATP mitocondrial inducido por glucosa no depende del AAC.

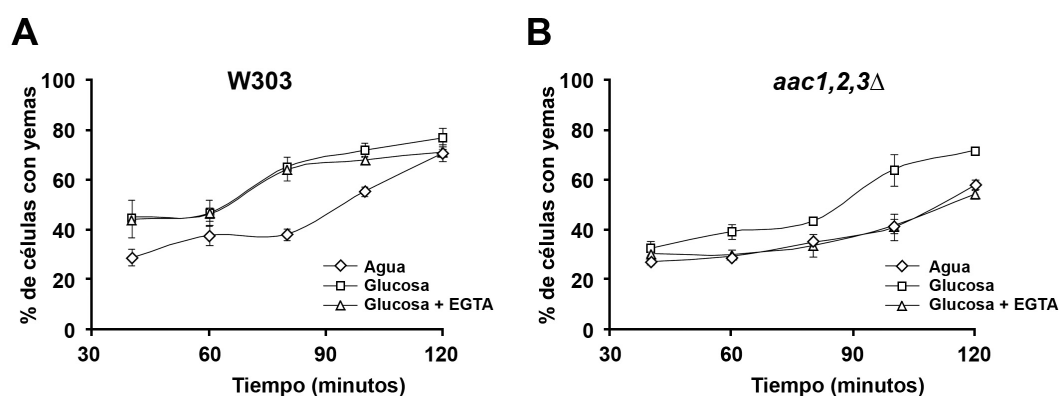
En cambio, la respuesta a glucosa se eliminó completamente en células *sal1* $\Delta$ , con sólo un incremento del  $9 \pm 8\%$  (media  $\pm$  SEM de seis experimentos independientes;  $p < 0,001$ , prueba de la t de Student, figura 4.14B), independientemente de la presencia o no de  $\text{Ca}^{2+}$  o BKA. Estos resultados muestran que la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glucosa provoca un incremento en los niveles de ATP mitocondrial, y que *Salp* es esencial para provocarlo.



**Figura 4.14. *Sal1p* es una diana de las señales de calcio *in vivo*.** Células W303 (A, C, D) y *sal1* $\Delta$  (B) transformadas con el plásmido pYX142-Cox4-Luc se crecieron en YPD, se lavaron y se dejaron sin nutrientes durante 8 horas. Después se añadió luciferina 0,5 mM en presencia de EGTA 10 mM (líneas grises) o EGTA 10 mM más  $\text{CaCl}_2$  30 mM (líneas negras) a pH 6,5 y se midió la luminiscencia cada 15 segundos. La flecha indica la adición de glucosa (A, B y D) o galactosa (C) 100 mM. En D, se añadió BKA 50  $\mu\text{M}$  antes de comenzar el experimento y el pH se disminuyó hasta 4,5. La concentración de ATP mitocondrial se expresó como la luminiscencia obtenida dividida entre la señal inicial. Los datos corresponden a un experimento representativo repetido más de 3 veces con resultados similares.



Granot y Snyder (Granot y Snyder, 1993) estudiaron la influencia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta a la glucosa en células en ayuno. Usaron EGTA durante la exposición a glucosa y concluyeron que el  $\text{Ca}^{2+}$  no estaba implicado en la respuesta a glucosa, ya que ninguno de los cambios fisiológicos provocados por la glucosa se bloqueaban en presencia del quelante. Debido a la redundancia que existe entre Sal1p y los AACs, nuestra hipótesis era que la importancia del  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta a glucosa podría reverlarse en ausencia de Aac2p. Por tanto, hemos estudiado el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  externo en la formación de yemas tras un ayuno en células W303, *sal1* $\Delta$  y *aac1,2,3* $\Delta$ . La figura 4.15 muestra la cinética de generación de yemas en células en fase estacionaria después de exposición durante 30 minutos a agua, glucosa o glucosa + EGTA antes de transferirlas a medio rico. Las células expuestas a glucosa crecen más rápido cuando se transfieren a medio rico que las expuestas a agua, y ese efecto no se ve modificado por la presencia de EGTA con la glucosa (figura 4.15A). El mismo efecto se ve en células *sal1* $\Delta$  (resultados no mostrados), lo que concuerda exactamente con el experimento de Granot y Snyder (Granot y Snyder, 1993). Sin embargo, en células sin AACs, la presencia de EGTA durante la exposición a glucosa bloqueó completamente el efecto de la glucosa (figura 4.15B). El comportamiento es similar al obtenido en una preincubación con agua. Estos resultados muestran que la ausencia de transportadores de ADP/ATP (concretamente Aac2p) desenmascara un papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización por glucosa en la levadura.



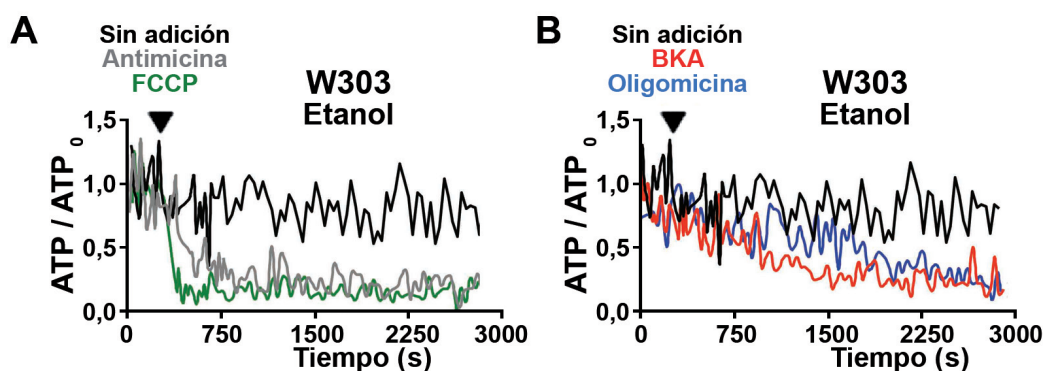
**Figura 4.15. Cinética de generación de yemas en levaduras después de un ayuno.** Células W303 (A) o *aac1,2,3* $\Delta$  (B) en fase estacionaria durante dos días se transfirieron a agua destilada, un medio con glucosa 2%, o un medio con glucosa 2 % más EGTA 10 mM. Tras 2 horas se transfirieron a YPD. El porcentaje de células con yemas se midió a varios tiempos después de la transferencia a medio rico. Los datos corresponden a un experimento representativo repetido 3 veces con resultados similares, y son la media  $\pm$  SEM de 3 campos, con más de 100 células por campo.

#### 1.10) LA MITOCONDRIA DE LEVADURAS QUE CRECEN AERÓBICAMENTE EN GLUCOSA CONSUME ATP.

En células de *S. cerevisiae* que crecen en glucosa en condiciones aerobias se reprime la transcripción de genes que codifican para proteínas mitocondriales (Johnston, 1999). Además, la contribución de la respiración al catabolismo y energética de la glucosa es muy pequeña (Lagunas, 1976, 1979; Lagunas et al., 1982). Esto ha llevado a sugerir que la mitocondria de levadura creciendo en glucosa puede estar parcialmente desacoplada, debido a la apertura de un canal en la membrana interna similar al PTP de mamíferos. Este canal es activado por ATP citosólico alto y

fosfato citosólico bajo, lo que ocurre en levaduras creciendo en glucosa (Prieto et al., 1992; Prieto et al., 1995). El transporte de nucleótidos de adenina en la mitocondria sigue siendo esencial durante el crecimiento en glucosa, ya que las células que carecen de los tres AACs y Sal1p no crecen (Chen, 2004; Caverio et al., 2005). Sin embargo, nunca se ha averiguado directamente la dirección del flujo de ATP durante el crecimiento aeróbico en glucosa. Para estudiar el flujo de ATP mitocondrial *in vivo* hemos utilizado células W303 y *sal1Δ* que expresan constitutivamente la luciferasa mitocondrial desde el vector pYX142-Cox4-Luc.

Cuando las células crecen en etanol, la adición de antimicina A o FCCP provoca, como se esperaba, una caída rápida de los niveles de ATP mitocondriales, debido a la hidrólisis de ATP por la  $H^+$ -ATP sintasa funcionando en reverso (figura 4.16A). La adición de BKA y oligomicina también causa una pérdida de ATP mitocondrial, aunque más despacio (figura 4.16B). Por tanto, todos los inhibidores causaron la pérdida del ATP mitocondrial durante el crecimiento en etanol en células W303 (figura 4.16) y *sal1Δ* (resultados no mostrados), lo que indica que los niveles de ATP mitocondrial dependen exclusivamente de la síntesis mitocondrial.

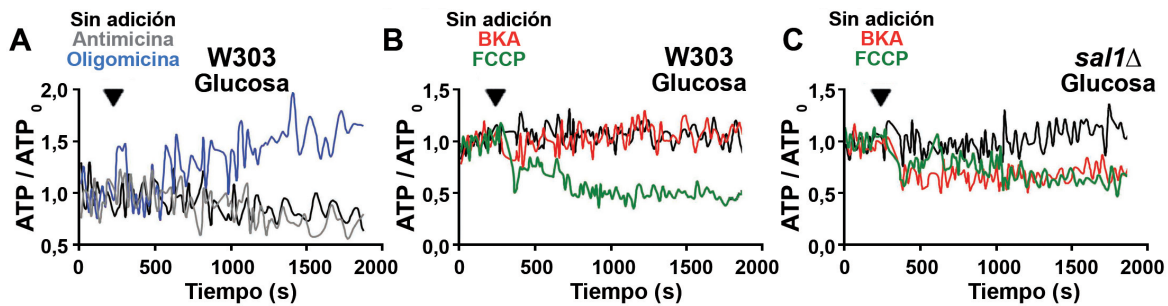


**Figura 4.16. ATP mitocondrial en células que crecen en etanol.** Células W303 transformadas con el plásmido pYX142-Cox4-Luc se crecieron en medio mínimo con etanol como fuente de carbono a pH 4,5. Después se añadió luciferina 0,5 mM y se midió la luminiscencia cada 15 segundos. La flecha indica la adición de antimicina A 1  $\mu$ M (gris), FCCP 1  $\mu$ M (verde), BKA 50  $\mu$ M (rojo) u oligomicina 12,5  $\mu$ g/mL (azul). La concentración de ATP mitocondrial se expresó como la luminiscencia dividida entre la señal inicial. Los datos corresponden a un experimento representativo repetido al menos 3 veces con resultados similares.

Por el contrario, en células creciendo exponencialmente en glucosa, el efecto de los inhibidores fue muy distinto. La adición de antimicina A, que detiene la respiración, no causó ningún efecto, lo que prueba que el ATP mitocondrial no depende de la respiración mitocondrial en células creciendo en glucosa (figura 4.17A). Además, la adición de oligomicina causó un incremento, en lugar de una pérdida de ATP, lo que sugiere que la  $H^+$ -ATP sintasa hidroliza ATP mitocondrial en lugar de sintetizarlo en células creciendo en glucosa (figura 4.17A). El bombeo de protones por la  $H^+$ -ATP sintasa o la hidrólisis de ATP por el fragmento  $F_1$ -ATPasa, acoplado al funcionamiento reverso del transportador de ADP/ATP, intercambio de  $ATP^4^-$  citosólico por  $ADP^{3-}$  mitocondrial, contribuye a la generación de potencial de membrana mitocondrial en anaerobiosis y levaduras  $\rho^0$ , sin *DNA* mitocondrial (*DNA*<sub>mit</sub>) respectivamente (Gbelská et al., 1983; Dupont et al., 1985; Lefebvre-Legendre, 2003), y probablemente también en levaduras creciendo en glucosa de forma aerobia.

El desacoplante FCCP produjo sólo la pérdida de alrededor del 50 % del ATP mitocondrial (figura 4.17B y C). El efecto de la adición de BKA fue diferente entre la cepa W303 y la cepa *sal1Δ*. La cepa *sal1Δ* perdió inmediatamente alrededor del 40-50 % de su ATP mitocondrial (figura 4.17C), mientras que la cepa W303 prácticamente no resultó afectada (figura 4.17B), lo que sugiere que en la cepa *wild type*, además del AAC, hay otro transportador activo en esas condiciones, probablemente Sal1p

Estos resultados indican que los AACs y Sal1p proporcionan ATP glucolítico a la mitocondria en levaduras creciendo en glucosa. En las células W303, Sal1p es capaz de mantener los niveles de ATP mitocondrial incluso en ausencia de la actividad del AAC. Esto explicaría por qué los mutantes en AAC son capaces de crecer en glucosa en aerobiosis (Drgon et al., 1991; Chen, 2004; Cavero et al., 2005).



**Figura 4.17. ATP mitocondrial en células que crecen en glucosa.** Células W303 (A y B) o *sal1Δ* (C) transformadas con el plásmido pYX142-Cox4-Luc se crecieron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono a pH 4,5. Después se añadió luciferina 0,5 mM y se midió la luminiscencia cada 15 segundos. La flecha indica la adición de antimicina A 1  $\mu$ M (gris), FCCP 1  $\mu$ M (verde), BKA 50  $\mu$ M (rojo) u oligomicina 12,5  $\mu$ g/mL (azul). La concentración de ATP mitocondrial se expresó como la luminiscencia dividida entre la señal inicial. Los datos corresponden a un experimento representativo repetido al menos 3 veces con resultados similares.

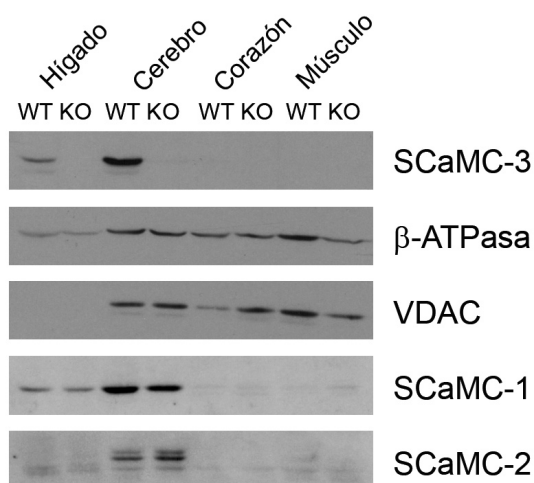


## 2. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi EN CEREBRO E HÍGADO, SCaMC-3.

### 2.1) EXPRESIÓN DE SCaMC-3 EN TEJIDOS DE RATÓN.

Los datos sobre la expresión de los transportadores de ATP-Mg/Pi en mamíferos no son concluyentes. Estudios de nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que SCaMC-1, SCaMC-2 y SCaMC-3 presentan una expresión ubicua. En humanos, se encuentra el mensajero de los tres genes en casi todos los tejidos estudiados: páncreas, riñón, músculo esquelético, hígado, pulmón, placenta, cerebro y corazón (del Arco y Satrústegui, 2004). Sólo la variante de *splicing* SCaMC-2c muestra una expresión restringida en cerebro. El cuarto parálogo, SCaMC-3L, sin dominio N-terminal con motivos EF, tiene también una expresión restringida al testículo. Estudios del grupo de Palmieri muestran una expresión ubicua similar, aunque detectan en humanos una variante de *splicing*, SCaMC-1a, con expresión restringida al testículo.

Sin embargo, ningún estudio ha mostrado aún los niveles de proteína presentes en los distintos tejidos. La figura 4.18 muestra que SCaMC-3 es la isoforma mayoritaria del transportador de ATP-Mg/Pi presente en hígado y cerebro de ratón. SCaMC-3 está ausente, por otra parte, en músculo esquelético y corazón. El ratón deficiente en SCaMC-3, SCaMC-3/*Slc25a23*<sup>-/-</sup> (ratón KO, en adelante) carece, como se esperaba, de la proteína SCaMC-3, mientras que la expresión de los otros dos parálogos, SCaMC-1 y SCaMC-2, no se ve alterada.



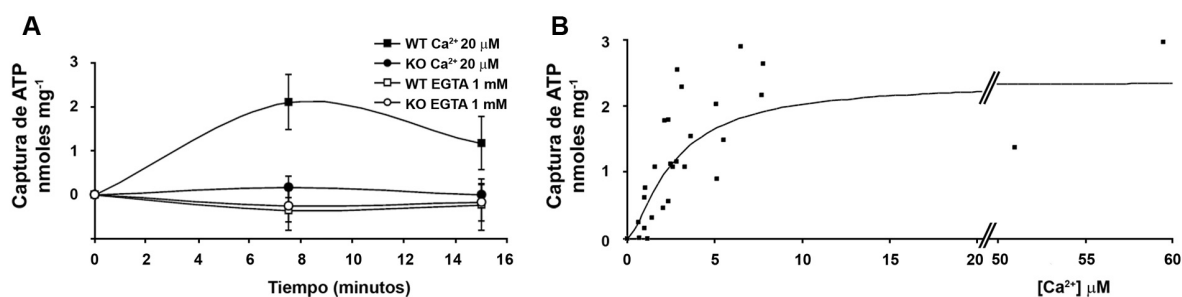
**Figura 4.18. Expresión de las isoformas de las SCaMCs en tejidos de ratón.** Western blot de mitocondrias de hígado, cerebro, corazón y músculo de ratones WT y KO para SCaMC-3 (15 µg por pocillo). Como control de carga se usaron VDAC y β-ATPase. SCaMC-3 es la isoforma mayoritaria en hígado y cerebro. SCaMC-1 y SCaMC-2 sólo se observan tras exposiciones largas. SCaMC-2 muestra varias bandas que corresponden a las distintas variantes.

El gen SCaMC-3 (*SLC25A23*) en humanos da lugar a varios *RNAs* mensajeros que difieren en el extremo C-terminal, mediante el uso de *splicing* alternativo provocado por la presencia de elementos Alu (del Arco, 2005). Sólo la isoforma SCaMC-3a está completa, ya que el resto carecen de la última hélice transmembrana, y probablemente no son funcionales. Sin embargo, en ratón y rata sólo existe

la isoforma general SCaMC-3a (del Arco, 2005), lo que facilita el estudio de dicho gen en tejidos de ratón.

## 2.2) SCaMC-3 ES EL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi DE HÍGADO DE RATÓN.

Hemos comprobado que SCaMC-3 cataliza el transporte de ATP-Mg en mitocondrias de hígado, como ya se demostró con SCaMC-1 y SCaMC-3 en proteoliposomas (Fiermonte et al., 2004). Para ello, hemos aislado mitocondrias de hígado de ratones *wild type* y *knock-out* de SCaMC-3. La mitocondria recién aislada de hígado de ratones WT contiene 1,0 nmol de ATP + ADP por mg de proteína. Se produce una captura de  $2,1 \pm 0,6$  nmoles de ATP por mg de proteína (media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes) después de una incubación de 7,5 minutos con ATP 4 mM (figura 4.19A) en presencia de  $20 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , pero no en presencia de EGTA. Mitocondrias de ratones SCaMC-3 KO tienen unos niveles iniciales de ATP + ADP similares a los de mitocondrias control (1,1 nmoles de ATP + ADP por mg de proteína), pero en ellas no se produce captura de ATP (figura 4.19A).



**Figura 4.19. Transporte de ATP a través de SCaMC-3 y su dependencia de calcio.** A) Captura de ATP (4 mM) en mitocondrias de hígado de ratones WT o SCaMC-3 KO en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  o EGTA. Los resultados son medias  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes. B) Activación por  $\text{Ca}^{2+}$  del transporte de ATP 4 mM después de 5 minutos en ratones WT. Se muestran los datos conjuntos de 5 experimentos independientes. Los datos se ajustaron utilizando el Sigma Plot v.9 a la misma ecuación que en la figura 4.7D.

El transporte de ATP es activado por  $\text{Ca}^{2+}$  externo en el rango micromolar (figura 4.19B). En el rango de  $\text{Ca}^{2+}$  libre nanomolar el transporte es nulo, y se satura a partir de  $\text{Ca}^{2+}$  libre  $10 \mu\text{M}$ . La  $S_{0.5}$  para  $\text{Ca}^{2+}$  es  $3,4 \pm 1,9 \mu\text{M}$  (media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes).

Estos resultados demuestran que SCaMC-3 es el único transportador neto de nucleótidos de adenina cuya actividad se puede detectar en mitocondrias de hígado de ratón. SCaMC-3 se corresponde con toda seguridad con el transportador de ATP-Mg/Pi descubierto por Aprille en mitocondrias de hígado de rata (Aprille, 1988; 1993). Aunque el grupo de Palmieri ya había demostrado que SCaMC-3 es el transportador de ATP-Mg/Pi en sus estudios en proteoliposomas (Fiermonte et al., 2004), nuestros resultados muestran la dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  del transportador por primera vez.

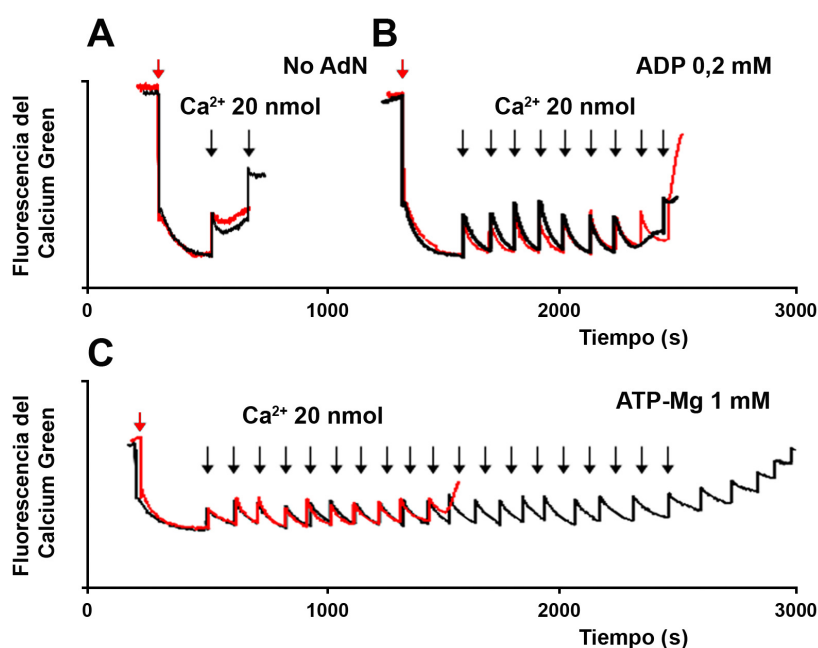
### 2.3) EL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi SCaMC-3 MODULA LA APERTURA DEL PTP EN MITOCONDRIA DE HÍGADO Y CEREBRO DE RATÓN.

En mitocondria aislada los nucleótidos de adenina ATP y ADP son un potente inhibidor del PTP. Por ejemplo, estudios del grupo de Wallace (Kokoszka et al., 2004) han puesto de manifiesto que la adición de ADP 0,125 mM aumenta al doble la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  (CRC) antes de la apertura del PTP (desde 40 hasta 80 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  por miligramo de proteína). Del mismo modo, estudios del grupo de Bernardi (Basso et al., 2005) muestran que la adición de ADP 0,1 mM y oligomicina 1,26  $\mu\text{M}$  también duplica la CRC (desde 120 hasta 250 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  por miligramo de proteína). Siempre se ha asumido que el ADP actúa a través del transportador de ADP/ATP (ANT), ya que los inhibidores del ANT, CAT y BKA, eliminan el efecto protector del nucleótido (Gizatullina et al., 2005). Además, la presencia de ADP a esas concentraciones no provoca ningún efecto en mitocondrias deficientes en ANT1 y ANT2 de hígado de ratón (Kokoszka et al., 2004).

Por otro lado, estudios del grupo de Gellerich (Gizatullina et al., 2005) han descubierto inhibición del PTP a través de un sitio de unión a nucleótidos de adenina de menor afinidad (en torno a 1 mM), y que es insensible a CAT y BKA. Gellerich postuló que el sitio de unión a ADP es externo, ya que en presencia de CAT y BKA el ADP no debería poder entrar a la matriz mitocondrial.

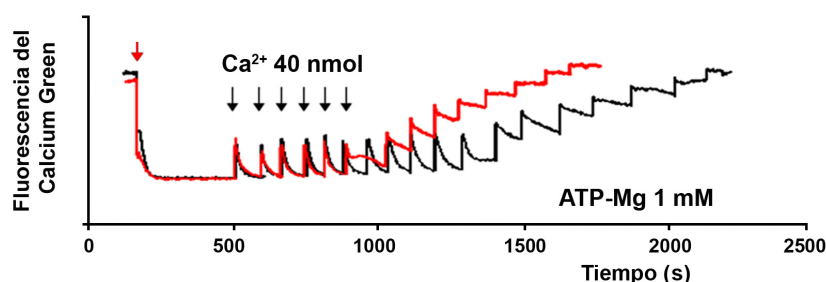
Finalmente, estudios del grupo de Aprille (Hagen et al., 2003) y otros estudios previos (Lapidus y Sokolove, 1993; Zoratti y Szabò, 1995) han demostrado que el PTP puede ser modulado por la concentración de nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial. El PTP se abre más rápidamente en mitocondrias vacías de ATP y ADP, y se abre más despacio en mitocondrias repletas de nucleótidos. Por todo esto, el transportador de ATP-Mg/Pi, al ser capaz de modificar el contenido neto de nucleótidos de adenina, puede ser un modulador importante del PTP.

Hemos estudiado la CRC en mitocondrias de hígado de ratones control y ratones *knock-out* de SCaMC-3. Las mitocondrias de ratones de ambos genotipos muestran una CRC similar en ausencia de nucleótidos de adenina (figura 4.20A) y también similar, aunque mucho mayor, en presencia de ADP 0,2 mM (figura 4.20B). Sin embargo, si utilizamos ATP 1 mM, las mitocondrias de ratones control muestran una CRC aumentada, pero no así las mitocondrias de ratones *knock-out* de SCaMC-3 (figura 4.20B). Si utilizamos ADP 1 mM el efecto es similar (resultados no mostrados). La CRC se dobla en los ratones control, pero no en los *knock-out*.



**Figura 4.20.** SCaMC-3 aumenta la CRC en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina en mitocondrias de hígado. La CRC de mitocondrias *wild type* (líneas negras) o SCaMC-3 KO (líneas rojas) se estudió utilizando Calcium Green-5N como sonda de  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial en ausencia de *AdN* (A) o en presencia de ADP 0,2 mM (B) o ATP-Mg 1 mM (C). La flecha roja indica la adición de las mitocondrias.

También hemos utilizado mitocondrias de cerebro. Estas mitocondrias son más resistentes a la apertura del PTP que las de hígado. Esto se debe probablemente a la menor cantidad de ciclofilina D (CyP-D) en la mitocondria de cerebro (Eliseev et al., 2007). En estas mitocondrias podemos ver el mismo efecto en presencia de ATP 1 mM (figura 4.21). Sin embargo, en cerebro no se produce una apertura del PTP rápida con la consiguiente salida del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, sino que se observa una pérdida progresiva de la velocidad de captura  $\text{Ca}^{2+}$ , hasta que la captura es nula. Estos resultados en mitocondrias de hígado y cerebro indican, por tanto, que el sitio de unión de nucleótidos de adenina con baja afinidad que inhibe el PTP hallado por Gellerich (Gizatullina et al., 2005) podría ser el transportador de ATP-Mg/Pi.



**Figura 4.21.** SCaMC-3 aumenta la CRC en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina en mitocondrias de cerebro. La CRC de mitocondrias *wild type* (líneas negras) o SCaMC-3 KO (líneas rojas) se estudió utilizando Calcium Green-5N en presencia de ATP-Mg 1 mM. La flecha roja indica la adición de las mitocondrias.

Si utilizamos el inhibidor de la CyP-D, y por tanto del PTP, ciclosporina A (CsA), podemos observar que la CRC aumenta en mitocondrias de hígado tanto en ratones control como *knock-out* (figura 4.22A). Sin embargo, el efecto de SCaMC-3 aún se puede observar, ya que las mitocondrias

control son capaces de captar más  $\text{Ca}^{2+}$  que las *knock-out*. Por otro lado, si utilizamos el inhibidor del ANT y estimulador del PTP, CAT, observamos que la CRC disminuye enormemente en ambos tipos de mitocondrias, pero aún se observan las diferencias entre los dos tipos de mitocondrias (figura 4.22B). Además, este experimento demuestra que el efecto de altas concentraciones de nucleótidos de adenina realmente es independiente del ANT, que está inhibido, como ya había sugerido el grupo de Gellerich (Gizatullina et al., 2005).

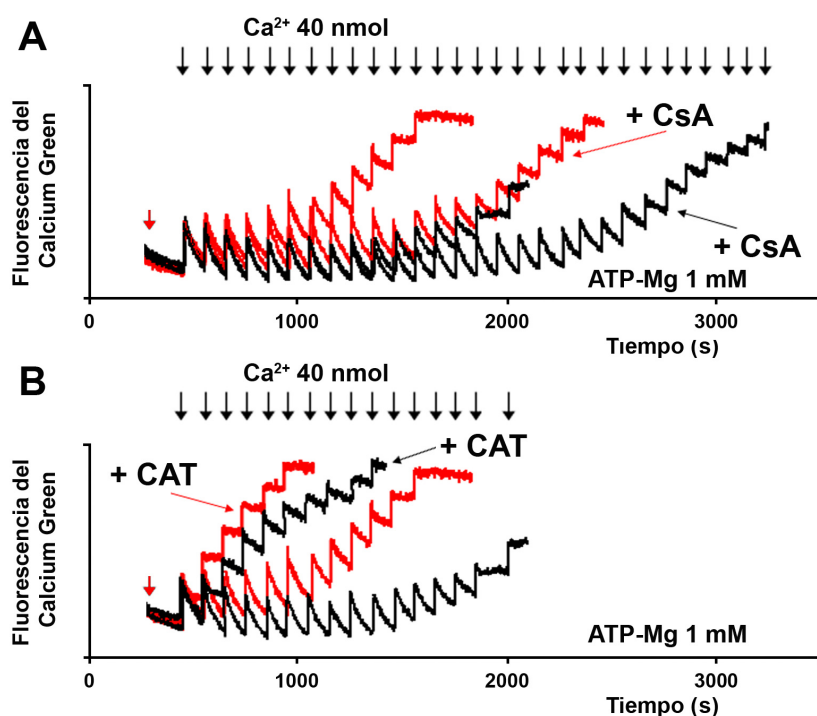
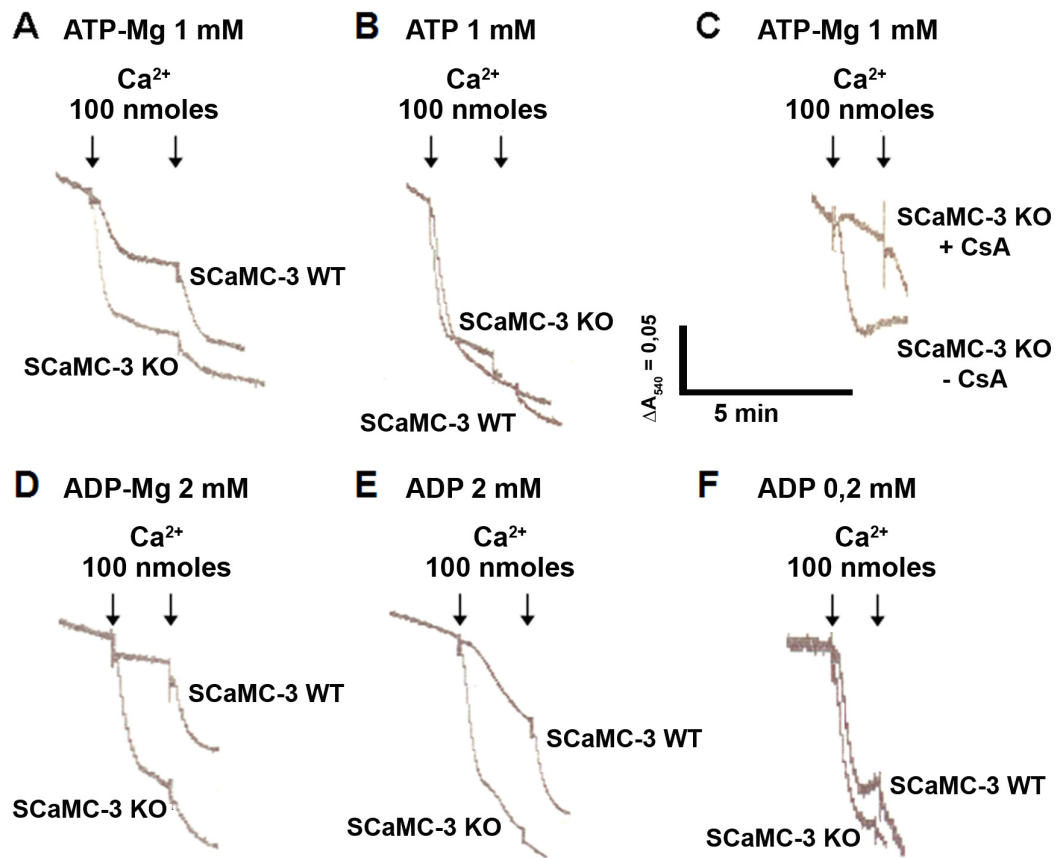


Figura 4.22. Efectos de la presencia de CsA y CAT en la CRC de mitocondrias de hígado. La CRC de mitocondrias *wild type* (líneas negras) o SCaMC-3 KO (líneas rojas) se estudió utilizando Calcium Green-5N. La flecha roja indica la adición de las mitocondrias. El medio contiene ATP-Mg 1 mM y las líneas indicadas llevan CsA (A) o CAT (B).

Resultados

Para el estudio del PTP en mitocondria aislada también hemos utilizado la técnica de hinchamiento (*swelling*) mitocondrial. La figura 4.23 muestra que las mitocondrias de hígado de ratones control están protegidas frente a la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ATP-Mg 1 mM, mientras que las de ratones *knock-out* de SCaMC-3 sufren un hinchamiento mucho mayor (figura 4.23A). Podemos ver el mismo efecto si utilizamos ADP-Mg 2 mM (figura 4.23D). Sin embargo, si utilizamos ATP sin  $\text{Mg}^{2+}$ , ambas mitocondrias muestran el mismo comportamiento (figura 4.23B). Esto es coherente con que el sustrato del transportador sea ATP-Mg y no ATP solo. Además, demuestra que el sitio por el cual protege el nucleótido no es externo, sino en la matriz, ya que debe ser transportado para tener efecto. Con respecto al ADP, sabemos que la especie transportada por el transportador de ATP-Mg/Pi es ADP solo (posiblemente en forma de HADP), y no ADP-Mg (Aprille, 1988, 1993; Fiermonte et al., 2004; Traba et al., 2008; Traba et al., 2009a). Eliminando el  $\text{Mg}^{2+}$  del medio de ensayo podemos observar que el ADP solo, a diferencia del ATP solo, sigue protegiendo en las mitocondrias de ratón control frente a las mitocondrias de ratón *knock-out* (figura 4.23E). La velocidad de *swelling* es mucho menor en las mitocondrias control que en las *knock-out*. Sin embargo, dicha protección no parece total, y esto es lógico, ya que el  $\text{Mg}^{2+}$  tiene un sitio de protección del PTP propio en la mitocondria, que no ha sido identificado aún. Como control de que el hinchamiento mitocondrial observado se debe a la apertura del PTP se utilizó CsA, que inhibe dicho hinchamiento, tanto en

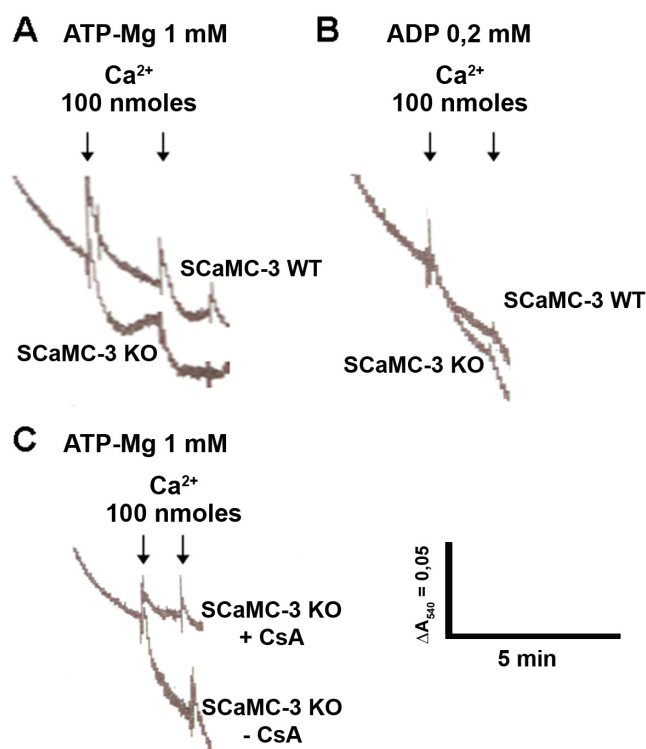
mitocondrias control (resultados no mostrados) como *knock-out* (figura 4.23C). Por otro lado, si utilizamos una concentración baja de ADP, de 0,2 mM, el hinchamiento es idéntico en mitocondrias control y en mitocondrias sin SCaMC-3 (figura 4.23



**Figura 4.23.** SCaMC-3 protege a las mitocondrias de hígado del hinchamiento inducido por  $Ca^{2+}$  en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina. El *swelling* en mitocondrias de hígado WT y SCaMC-3 KO después de la adición de  $Ca^{2+}$  se midió siguiendo la absorbancia a 540 nm de la suspensión en presencia de: **A)** ATP-Mg 1 mM; **B)** ATP 1 mM; **C)** ATP-Mg 1 mM en presencia o ausencia de CsA 5  $\mu$ M; **D)** ADP-Mg 2 mM; **E)** ADP 2 mM; **F)** ADP 0,2 mM.

En mitocondrias de cerebro el *swelling* es mucho menor que en mitocondrias de hígado, pero aun así, se pueden observar diferencias entre mitocondrias de ratones control y de ratones *knock-out* de SCaMC-3, tanto con ATP-Mg 1 mM (figura 4.24A), como con ADP 2 mM (resultados no mostrados), pero no en presencia de ATP solo. Con ADP 0,2 mM de nuevo ambas mitocondrias muestran el mismo hinchamiento (figura 4.24B). Como en el caso de las mitocondrias de hígado, la CsA protege contra el *swelling*, lo que demuestra que se debe a la apertura del PTP (figura 4.24C).





**Figura 4.24.** SCaMC-3 protege en mitocondrias de cerebro del hinchamiento inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina. El *swelling* en mitocondrias de cerebro WT y SCaMC-3 KO después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  se midió siguiendo la absorbancia a 540 nm de la suspensión en presencia de: A) ATP-Mg 1 mM; B) ADP 0,2 mM; C) ATP-Mg 1 mM en presencia o ausencia de CsA 5  $\mu\text{M}$ . En mitocondrias WT en presencia de ATP-Mg (A) se observa una aparente contracción (aumento de absorción a 540nm) cuando se añade  $\text{Ca}^{2+}$  al medio (ver apartado 3.5 para una explicación).

Por otro lado, hemos estudiado el *swelling* en mitocondrias de corazón y mitocondrias de músculo esquelético y no hemos encontrado diferencias entre ratones control y ratones *knock-out* de SCaMC-3 (resultados no mostrados). Estos resultados concuerdan con el hecho de que no hemos detectado expresión de SCaMC-3 en dichos tejidos.

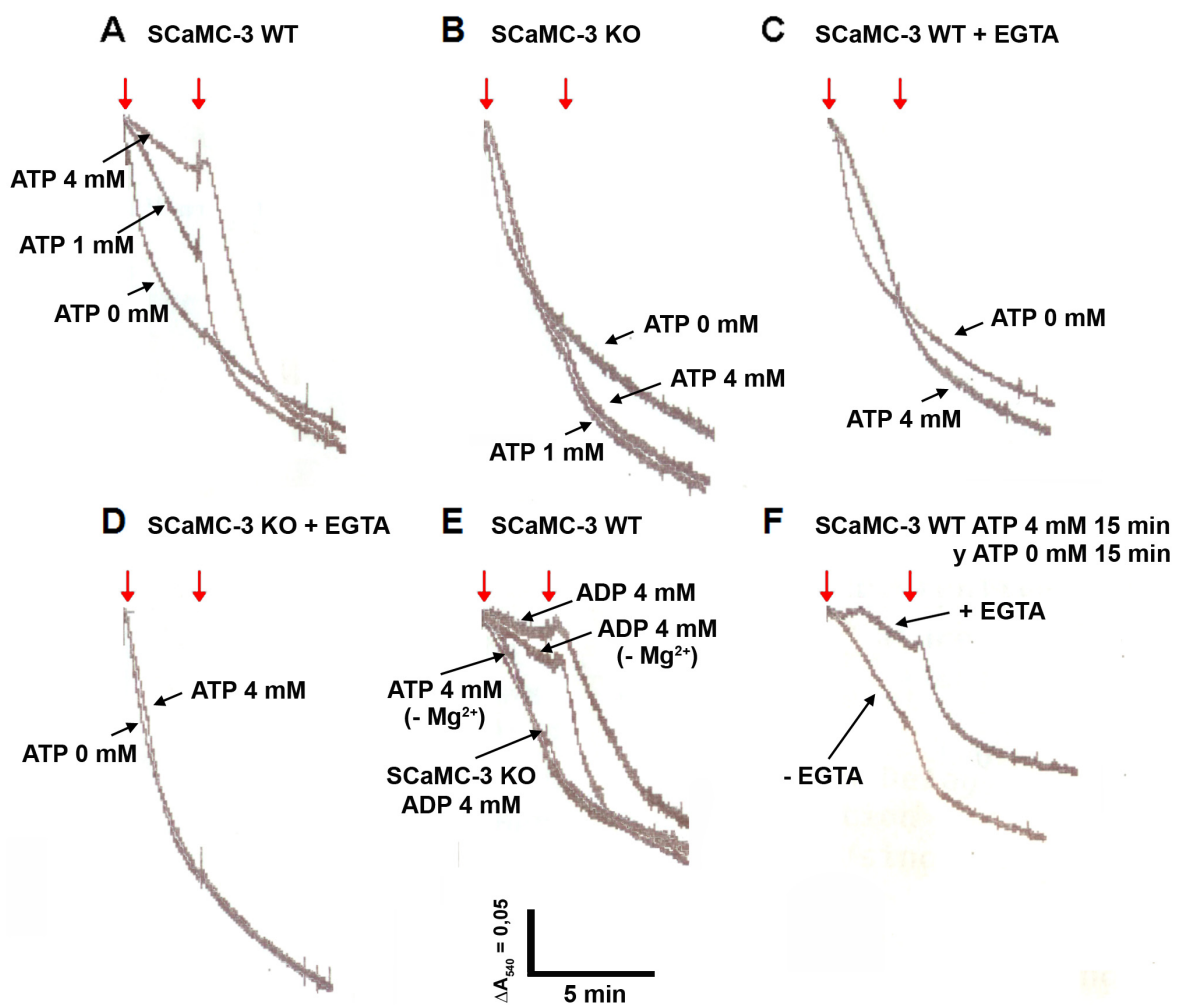
#### 2.4) EL EFECTO DE SCaMC-3 EN EL PTP SE DEBE A LA MODIFICACIÓN DEL CONTENIDO NETO DE NUCLEÓTIDOS DE ADENINA.

Nuestros resultados indican que el transportador SCaMC-3 modula la apertura del PTP en mitocondrias de hígado y cerebro cuando hay altas concentraciones de nucleótidos de adenina en el medio externo. Sin embargo, para comprobar que realmente es la concentración interna de nucleótidos de adenina lo que modula el PTP, hemos realizado ensayos de transporte de nucleótidos, seguidos de ensayos de *swelling* mitocondrial en ausencia de nucleótidos en el medio de ensayo.

En estos experimentos, la concentración intramitocondrial de nucleótidos de adenina se modificó preincubando las mitocondrias con varias concentraciones de ATP entre 0 y 4 mM a 30 °C durante 15 minutos. Después se lavaron y se incubaron sin nucleótidos o  $\text{Mg}^{2+}$  en presencia de fosfato 2 mM y  $\text{Ca}^{2+}$  10  $\mu\text{M}$ . Se observó el *swelling* antes y después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  20  $\mu\text{M}$ .

La figura 4.25 muestra que las mitocondrias de hígado del ratón control son más resistentes al *swelling* cuando han sido llenadas previamente de nucleótidos de adenina, como ya observó el grupo de Aprille (Hagen et al., 2003). El efecto depende de la cantidad de nucleótidos de adenina que hubiera en el medio durante el llenado (figura 4.25A). Además, cuando el llenado se realizó en presencia de EGTA, las mitocondrias no se llenaron de nucleótidos, y por tanto no mostraron más protección

(figura 4.25C). Del mismo modo, si el medio de llenado carecía de  $Mg^{2+}$ , tampoco se llenaron, y no aumentó la protección (figura 4.25E). Si se utiliza ADP 4 mM para llenar las mitocondrias el efecto es el mismo que con ATP, aunque el ADP si es capaz de proteger cuando el llenado se realiza sin  $Mg^{2+}$  (figura 4.25E), ya que el ADP es transportado sin el catión divalente (Aprille, 1988, 1993; Joyal and Aprille, 1992; Fiermonte et al, 2004; Traba et al., 2008; Traba et al., 2009a). Finalmente, el efecto del llenado es reversible (figura 4.25F), ya que si después del llenado con ATP 4 mM se incuban en un medio sin nucleótidos de adenina durante 15 minutos, lo que provoca la salida de los nucleótidos, se pierde de nuevo la protección. Si la incubación sin nucleótidos se realiza en presencia de EGTA, los nucleótidos no salen de la mitocondria y la protección se mantiene.



**Figura 4.25. La modificación del contenido de nucleótidos de adenina intramitocondrial altera la apertura del PTP.** Mitocondrias WT (A, C) o KO (B, D) de hígado se preincubaron con ATP 0, 1 ó 4 mM durante 15 minutos en presencia de  $Mg^{2+}$  y en ausencia (A, B) o presencia (C, D) de EGTA. Se lavaron y se transfirieron a un medio sin  $Mg^{2+}$  o nucleótidos en presencia de fosfato 2 mM y  $Ca^{2+}$  10  $\mu$ M. La primera flecha roja indica la adición de las mitocondrias a este medio y la segunda indica la adición de  $Ca^{2+}$  20  $\mu$ M. En E se utilizó ATP o ADP 4 mM durante la preincubación en mitocondrias WT y KO en ausencia de EGTA y en presencia o ausencia de  $Mg^{2+}$  según se indica. En F, las mitocondrias se preincubaron con ATP 4 mM durante 15 minutos en presencia de  $Mg^{2+}$ , y después se incubaron en un medio sin nucleótidos durante 15 minutos en presencia o ausencia de EGTA según se indica, antes de la adición a este medio.



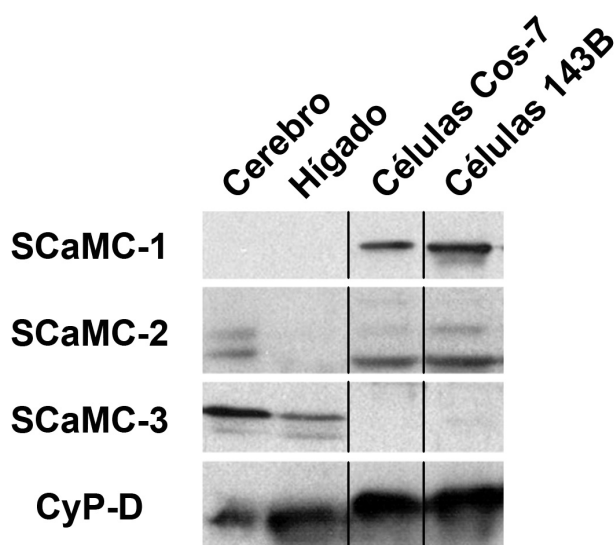
Por otro lado, en las mitocondrias de hígado del ratón KO el comportamiento es idéntico con cualquier tratamiento (figura 4.25 B, D y E). Estos resultados demuestran que efectivamente es la concentración de nucleótidos de adenina en la matriz lo que determina si el PTP se abre o no, y que el efecto de SCaMC-3 en el PTP tiene lugar en la matriz mitocondrial.

### 3. CARACTERIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi EN CÉLULAS, SCaMC-1.

#### 3.1) SCaMC-1 ES EL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi PRESENTE EN LÍNEAS CELULARES.

El gen SCaMC-1(SLC25A24) en humanos da lugar a dos *RNAs* mensajeros que difieren en el primer exón, mediante el uso de promotor 1 alternativo (Satrústegui et al., 2007). La isoforma general SCaMC-1 fue identificada en nuestro laboratorio (del Arco y Satrústegui, 2004), y consta de 477 aminoácidos. La segunda isoforma SCaMC-1a fue identificada en el laboratorio de Ferdinando Palmieri (Fiermonte et al., 2004), consta de 458 aminoácidos y tiene una expresión restringida al testículo. Por otra parte, en ratón y rata sólo existe la isoforma general SCaMC-1, ya que no existe el promotor alternativo.

La figura 4.26 muestra que SCaMC-1 es el transportador de ATP-Mg/Pi mayoritario en líneas celulares como Cos-7 o 143B, mientras que la expresión de SCaMC-2 y SCaMC-3 es mucho menor. Por otra parte, SCaMC-1 tiene una expresión muy reducida en tejidos de ratón. Por todo ello, las células en cultivo son el sistema ideal para estudiar la actividad y función de SCaMC-1.

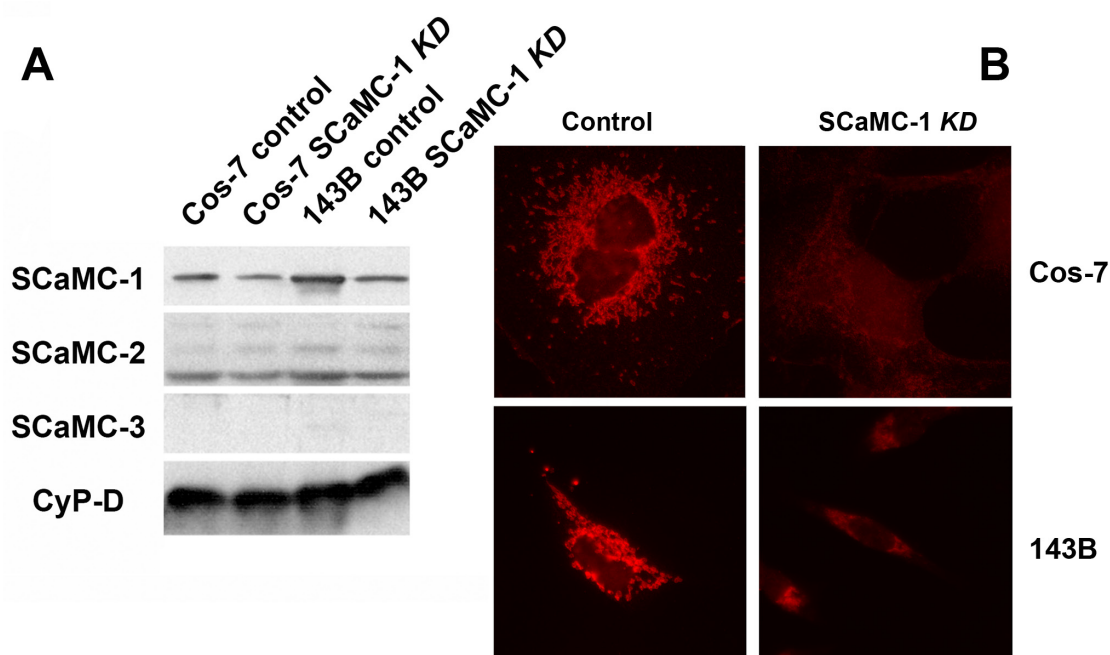


**Figura 4.26. Expresión de las isoformas de las SCaMCs en líneas celulares y tejidos.** Western blot de mitocondrias aisladas de hígado, cerebro de ratón y células Cos-7 y 143B (5 µg por pocillo). Como control de carga se usó CyP-D. SCaMC-1 es la isoforma mayoritaria en líneas celulares analizadas. SCaMC-3 es indetectable y SCaMC-2 sólo se observa tras exposiciones largas.

#### 3.2) SILENCIAMIENTO DE SCaMC-1 EN LÍNEAS CELULARES.

Los plásmidos pSUPER.retro.neo+gfp-SCaMC-1 y el plásmido control vacío pSuper.retro.neo+gfp se transfectaron en células Cos-7 y 143B para generar líneas estables. Los transfectantes estables se obtuvieron incubando las células con G418 500 µg/mL durante varios días. Se aislaron más de diez clones por cada plásmido y línea celular. Se analizó la eficacia del vector pSUPER.retro.neo+gfp-SCaMC-1 para disminuir la expresión de SCaMC-1 mediante western blot e inmunofluorescencia en todos los clones obtenidos. Como puede verse en la figura 4.27, obtuvimos un clon de células Cos-7 que posee una menor expresión de SCaMC-1 (denominado a partir de ahora

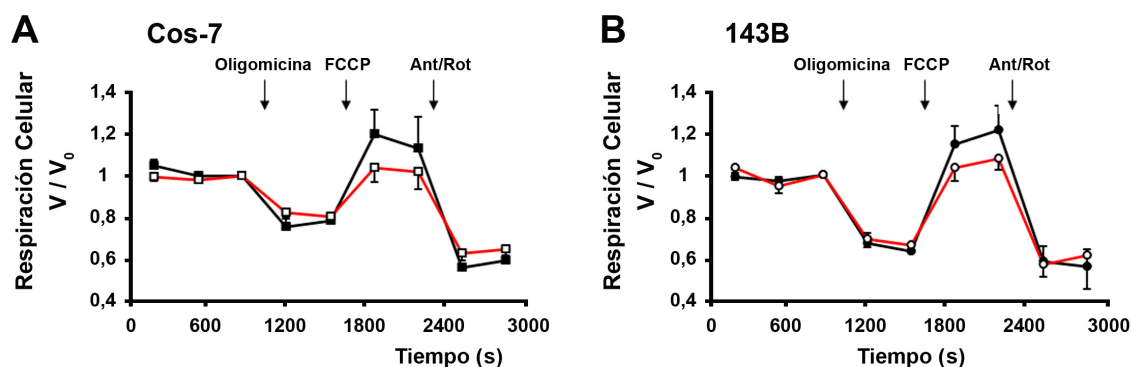
Cos-7 SCaMC-1 *knock-down* o *KD*), mientras que el resto de los clones no mostraron una reducción equivalente (resultados no mostrados). También obtuvimos un clon de células 143B que posee una menor expresión de SCaMC-1 (denominado a partir de ahora 143B SCaMC-1 *knock-down* o *KD*). En ambos clones *knock-down*, SCaMC-1 es prácticamente indetectable por inmunofluorescencia, aunque sí se detecta por western blot.



**Figura 4.27. Silenciamiento de SCaMC-1 en células Cos-7 y 143B mediante shRNA.** A) Western blot de mitocondrias aisladas de células Cos-7 y 143B (5 µg por pocillo). Como control de carga se usó CyP-D. Los niveles de SCaMC-1 han disminuido en los clones SCaMC-1 *knock-down*. B) Inmunofluorescencia en células Cos-7 y 143B utilizando anticuerpos específicos contra SCaMC-1. SCaMC-1 es prácticamente indetectable en los clones SCaMC-1 *knock-down*.

### 3.3) RESPIRACIÓN Y POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS INTACTAS.

Para caracterizar el efecto del silenciamiento de SCaMC-1 en la función mitocondrial hemos medido la velocidad de respiración y eficiencia de acoplamiento mitocondrial en células intactas. Las células se cultivaron en placas especiales de 24 pocillos y se midió el consumo de oxígeno utilizando un Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer. La respiración basal en células Cos-7 fue de  $99 \pm 7$  y  $111 \pm 31$  pmoles de oxígeno  $\text{min}^{-1}$  por  $10^4$  células control y *knock-down* respectivamente y en células 143B fue de  $178 \pm 64$  y  $186 \pm 56$  pmoles de oxígeno  $\text{min}^{-1}$  por  $10^4$  células control y *knock-down* respectivamente. La figura 4.28 muestra que el consumo de oxígeno disminuyó cuando se inhibió la síntesis de ATP con oligomicina, se estimuló cuando se desacopló la cadena respiratoria con el protonóforo FCCP y se inhibió de nuevo cuando el transporte de electrones se detuvo con una mezcla de rotenona (que inhibe al complejo I) y anticimina A (que inhibe al complejo III). A nivel de la célula entera no observamos diferencias significativas entre células control y células *knock-down* para SCaMC-1.



**Figura 4.28. Análisis de la respiración en células control y SCaMC-1 *knock-down* intactas.** El consumo de oxígeno de células Cos7 (A) o 143B (B) se midió en placas de 24 pocillos utilizando un Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer. La tasa de consumo de oxígeno se expresa como la tasa en cada punto ( $V$ ) dividida entre la tasa basal ( $V_0$ , la tasa justo antes de la adición de oligomicina). En los puntos indicados se inyectó de forma automática oligomicina 6  $\mu$ M, FCCP 1  $\mu$ M, y una mezcla de rotenona 1  $\mu$ M y antimicina A 1  $\mu$ M (Ant/Rot). Las líneas negras y símbolos cerrados indican las líneas control, mientras que las líneas rojas y símbolos abiertos indican las líneas SCaMC-1 *knock-down*. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6 (B) ó 7 (A) experimentos independientes. La posible disminución en los efectos del FCCP (*sparse respiratory capacity*, Choi et al., 2009) en células SCaMC-1 KD será analizada en estudios posteriores.

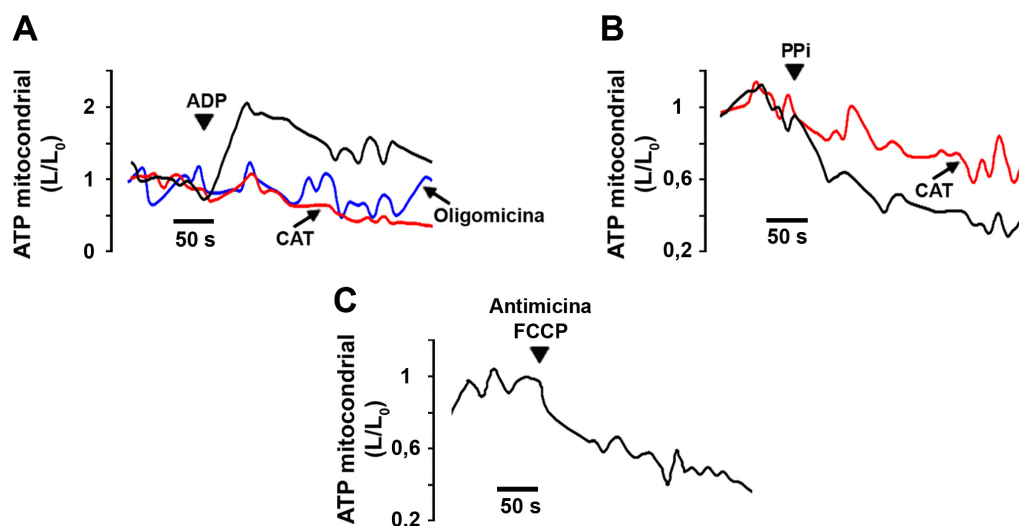
También hemos medido el  $\Delta\Psi$  mitocondrial por citometría de flujo utilizando un indicador potenciométrico mitocondrial, como el TMRM. Las células SCaMC1 *knock-down* no muestran defectos significativos en la generación de  $\Delta\Psi$  (resultados no mostrados). La adición de oligomicina, que inhibe la  $H^+$ -ATP sintasa mitocondrial, y por tanto produce una acumulación de  $H^+$  en el espacio intermembrana, hiperpolariza la mitocondria, como era de esperar, mientras que la adición del protonóforo FCCP disipa el  $\Delta\Psi$ . Estos resultados prueban que las células SCaMC-1 *knock-down*, por tanto, no muestran ninguna alteración grave en la función mitocondrial.

### 3.4) LAS MITOCONDRIAS DE CÉLULAS Cos-7 MUESTRAN ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi.

Se transfectó la línea Cos-7 de forma estable con el plásmido pIRES-hygro-Cox8-Luc, que codifica para la luciferasa mitocondrial. Se obtuvieron clones estables incubando las células con higromicina 250  $\mu$ g/mL durante varios días, y se eligió una de estos clones para los siguientes ensayos. Mitocondrias aisladas de este clon de células Cos-7 muestran luminiscencia después de la adición de luciferina 0,2 mM. Esa luminiscencia se corresponde con los niveles basales de ATP mitocondrial.

Se comprobó en primer lugar que las mitocondrias aisladas eran capaces de realizar fosforilación oxidativa y que la luciferasa mitocondrial era capaz de detectarlo, al igual que hicimos en levaduras. La adición de ADP 0,5 mM en un medio con  $Ca^{2+}$  libre bajo se siguió de un aumento rápido en los niveles de ATP, que es inhibido por 6  $\mu$ M oligomicina (figura 4.29A). La presencia de CAT 10  $\mu$ M, que inhibe al ANT y por tanto la entrada de ADP bloqueó también el aumento de ATP mitocondrial (figura 4.29A). El PPi, que puede ser intercambiado por nucleótidos de adenina a través del ANT (Aprille, 1988), causó la salida del ATP mitocondrial, de forma sensible a CAT (figura 4.29B).

Finalmente la adición de antimicina A y FCCP produce la hidrólisis del ATP mitocondrial (figura 4.29C). Estos resultados demuestran la validez de la luciferasa mitocondrial como sonda de ATP también en mitocondrias de células.

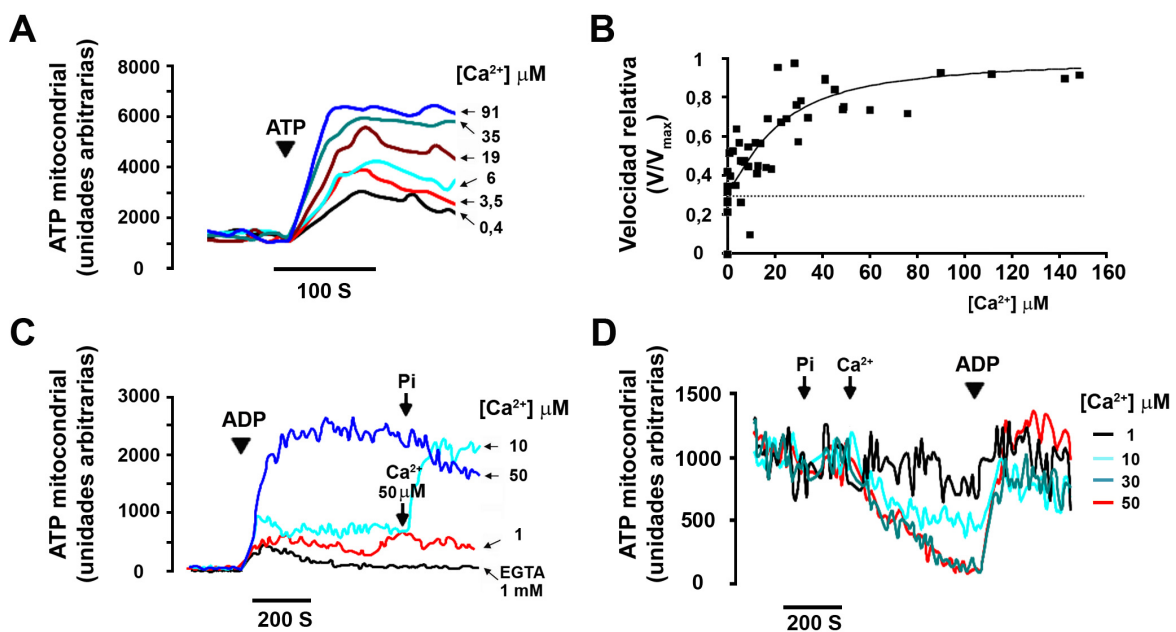


**Figura 4.29. La luciferasa mitocondrial en células es capaz de detectar cambios en los niveles de ATP.** Mitocondrias de células Cos-7 transfectadas de forma estable con el plásmido pIRES-hygro-Cox8-Luc se incubaron con succinato 5 mM como sustrato respiratorio,  $MgCl_2$  5 mM, RR 200 nM, EGTA 1 mM ( $Ca^{2+}$  libre en el rango nanomolar) y luciferina 0,2 mM en ausencia (líneas negras) o presencia de CAT 10  $\mu$ M (líneas rojas) u oligomicina 6  $\mu$ M (línea azul). La punta de flecha indica la adición de ADP 0,5 mM (A), PPI (B) o una mezcla de antimicina A 1  $\mu$ M y FCCP 1  $\mu$ M (C). La concentración de ATP se expresa como la señal de luz (L) dividida por la señal inicial ( $L_0$ ).

En presencia de CAT para inhibir el transporte de ATP a través del ANT, y rojo de rutenio (RR) 200 nM para inhibir el uniportador de  $Ca^{2+}$  (CaU), se observó transporte de ATP 1 mM, y ese transporte se estimuló a medida que se aumentó la concentración de  $Ca^{2+}$  libre en el medio (figura 4.30A y B). La  $S_{0,5}$  para  $Ca^{2+}$  del transporte es  $12,7 \pm 5,3$   $\mu$ M (media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes, figura 4.30B). Sin embargo, a diferencia del transporte de ATP a través de Sal1p y SCaMC-3, se observó transporte incluso a concentraciones muy bajas de  $Ca^{2+}$  (en torno a un 25 % de la velocidad máxima). También se ensayó el transporte de ADP 1 mM, que se vio estimulado en el mismo rango de concentraciones de  $Ca^{2+}$  libre (resultados no mostrados), aunque en este caso el transporte basal con bajo  $Ca^{2+}$  fue prácticamente nulo. La entrada de ADP dependiente de  $Ca^{2+}$  se sigue produciendo en mitocondrias que han sido vaciadas de nucleótidos de adenina por preincubación con PPI 2 mM (figura 4.30C). Si después de la adición de ADP se aumenta la concentración de  $Ca^{2+}$  libre del medio, el transporte se ve estimulado aún más (figura 4.30C, línea azul claro), y si se aumenta la concentración de Pi del medio, el transporte se invierte (figura 4.30C, línea azul oscuro). Finalmente, se estudió la reversibilidad del transporte añadiendo Pi 10 mM en un medio libre de nucleótidos, y se observó la pérdida de ATP mitocondrial de forma dependiente de  $Ca^{2+}$  (figura 4.30D). El hecho de que en presencia de  $Ca^{2+}$  libre muy bajo no se observe prácticamente transporte de ADP (figura 4.30C), ni salida de ATP estimulada por Pi (figura 4.30D), sugiere que el transportador realmente

es inactivo cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  libre es muy bajo. Que sí se observe una pequeña entrada de ATP en esas condiciones (figura 4.30A y B) sugiere que podría haber otro mecanismo de entrada de ATP de baja velocidad en esas mitocondrias, o también que podría haber una pequeña proporción de mitocondrias dañadas que han liberado luciferasa al medio, o que presentan poros en su membrana por los que entra ATP de manera inespecífica.

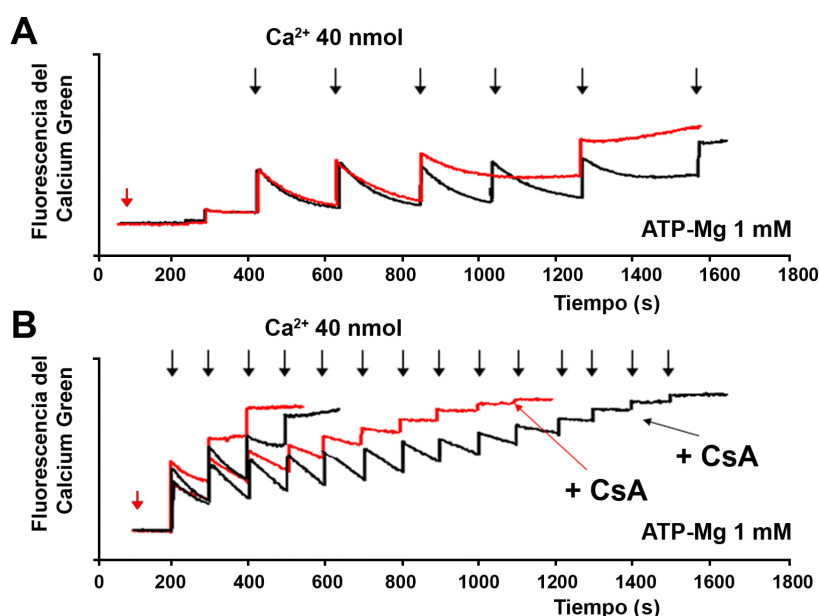
Desafortunadamente, los numerosos intentos de generar una línea Cos-7 SCaMC-1 *knock-down* que expresara de forma estable la luciferasa mitocondrial han fallado por razones desconocidas. Sin embargo, todos los datos apuntan a que SCaMC-1 es efectivamente responsable de este transporte de nucleótidos insensible a CAT y dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Será necesario utilizar otras estrategias para atribuir de forma inequívoca este transporte a SCaMC-1.



**Figura 4.30. Transporte de ATP insensible a CAT en mitocondrias de células Cos-7.** A) Mitocondrias de células Cos-7 transfectadas de forma estable con el plásmido pIRES-hygro-Cox8-Luc se incubaron con succinato 5 mM como sustrato respiratorio,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, RR 200 nM, CAT 20  $\mu\text{M}$ , luciferina 0,2 mM y las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre indicadas. La punta de flecha indica la adición de ATP 1 mM. B) Activación por  $\text{Ca}^{2+}$  del transporte de ATP 1 mM. Se muestran los datos conjuntos de 6 experimentos independientes. Los datos se ajustaron utilizando el Sigma Plot v.9 a la misma ecuación que en la figura 4.7D. La velocidad de transporte se expresa como la velocidad obtenida con cada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $V$ ) dividida entre la velocidad obtenida con  $\text{Ca}^{2+}$  saturante ( $V_{\text{max}}$ ). La línea de puntos indica la velocidad basal con  $\text{Ca}^{2+}$  libre  $\approx 0$   $\mu\text{M}$ . C) Las mitocondrias se preincubaron en un medio con PPi durante 5 minutos para vaciar la mitocondria de nucleótidos de adenina a través del ANT. Después se incubaron con el mismo medio del panel A con las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre o EGTA indicadas y se comenzó a medir la luminiscencia, que inicialmente es prácticamente nula por estar la mitocondria vacía. La punta de flecha indica la adición de ADP 1 mM. En la línea con  $\text{Ca}^{2+}$  libre 10  $\mu\text{M}$  (azul claro) se añadió donde se indica  $\text{Ca}^{2+}$  50  $\mu\text{M}$ . En la línea con  $\text{Ca}^{2+}$  libre 50  $\mu\text{M}$  (azul oscuro) se añadió donde se indica Pi 10 mM. D) Las mitocondrias se incubaron con el mismo medio del panel A. Donde se indica se añadió Pi 10 mM, y después se añadieron las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  libre indicadas. Finalmente, la punta de flecha indica la adición de ADP 1 mM.

### 3.5) EL TRANSPORTADOR DE ATP-Mg/Pi, SCAMC-1 MODULA LA CAPACIDAD DE ACUMULACIÓN DE CALCIO Y LA APERTURA DEL PTP EN MITOCONDRIAS DE LÍNEAS CELULARES.

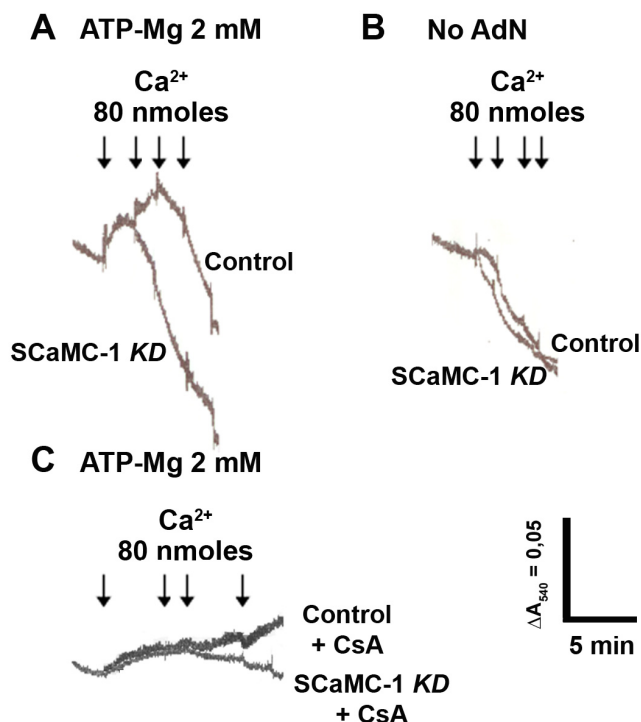
Para comprobar si el transportador de ATP-Mg/Pi en mitocondrias de líneas celulares regula la capacidad de acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria y la apertura del PTP, al igual que en hígado y cerebro de ratón, estudiamos la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando la sonda Calcium Green. Las mitocondrias de células control en presencia de ATP-Mg 1 mM son capaces de acumular más  $\text{Ca}^{2+}$  que las mitocondrias SCaMC-1 *knock-down*, antes de la apertura del PTP y la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado (figura 4.31A). Esta diferencia se mantiene en presencia del inhibidor del PTP, CsA, que al igual que en mitocondrias de hígado (figura 4.22A), aumenta considerablemente la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias incubadas en presencia de ATP-Mg (figura 4.31B).



**Figura 4.31.** SCaMC-1 aumenta la CRC en mitocondrias de células Cos-7 en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina. Mitocondrias (0,25 mg/mL) control (líneas negras) muestran una CRC mayor que las SCaMC-1 KD (líneas rojas) en presencia de ATP-Mg 1 mM. La flecha roja indica la adición de las mitocondrias. En B, se añadió CsA 5  $\mu\text{M}$  en las líneas que se indica para retrasar la apertura del PTP, aunque las diferencias entre mitocondrias control y KD se siguen observando.

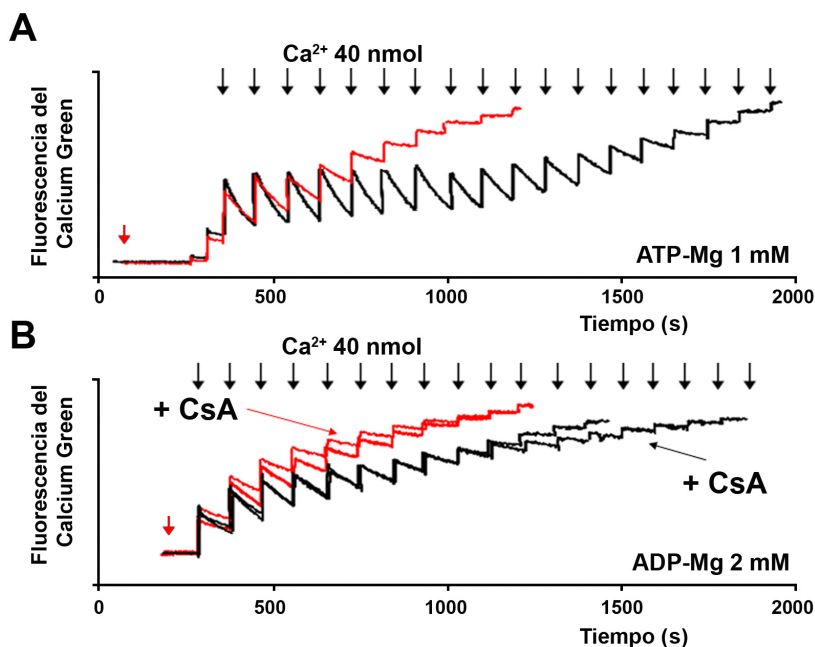
La apertura del PTP puede ser estudiada observando el hinchamiento mitocondrial como disminución de la absorción a 540nm. La figura 4.32A muestra que adiciones sucesivas de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan primero un aumento, y luego una disminución de la absorción (*swelling*) en mitocondrias células Cos-7 control y SCaMC-1 *knock-down* en presencia de ATP-Mg 2 mM. El número de adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarias para provocar *swelling* es siempre mayor en las mitocondrias de control que en las SCaMC-1 *knock-down*. Sin embargo, en ausencia de nucleótidos de adenina el *swelling* es idéntico (figura 4.32B). El *swelling* mitocondrial es inhibido en presencia de CsA (figura 4.32C).





**Figura 4.32.** Hinchamiento en mitocondrias control y SCaMC-1 *knock-down* de células Cos-7 después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ . El swelling se midió siguiendo la absorbancia a 540 nm de la suspensión: **A)** en presencia de ATP-Mg 2 mM; **B)** en ausencia de nucleótidos de adenina; **C)** en presencia de ATP-Mg 2 mM y CsA 5  $\mu\text{M}$ .

Para confirmar que la apertura del PTP está estimulada por la ausencia de SCaMC-1 de manera específica hemos utilizado otra línea celular. En la línea de osteosarcoma humano 143B obtuvimos los mismos resultados, tanto en captura de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ATP y ADP (figura 4.33) como en *swelling* mitocondrial, (figura 4.34).

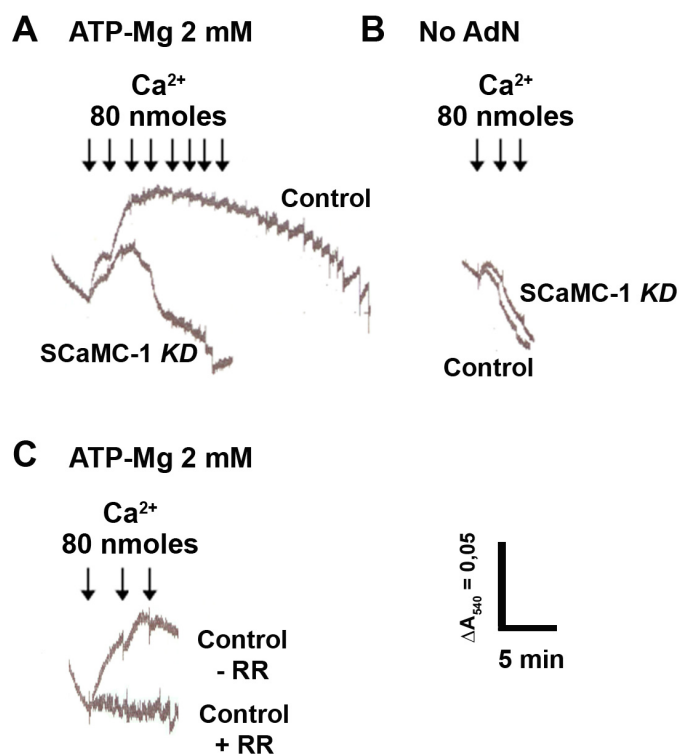


**Figura 4.33.** SCaMC-1 aumenta la CRC en mitocondrias de células 143B en presencia de concentraciones altas de nucleótidos de adenina. Mitocondrias (0,25 mg/mL) control (líneas negras) muestran una CRC mayor que las SCaMC-1 *KD* (líneas rojas) en presencia de ATP-Mg 1 mM (**A**) o ADP-Mg 2 mM (**B**). La flecha roja indica la adición de las mitocondrias. En **B**, se añadió CsA 5  $\mu\text{M}$  en las líneas que se indica para retrasar la apertura del PTP. La adición de CsA no tiene ningún efecto en mitocondrias *KD* y sólo un efecto marginal en las mitocondrias control.

Se ha observado que las mitocondrias de células 143B son capaces de captar más  $\text{Ca}^{2+}$  que las mitocondrias de células Cos-7, pero, alcanzado ese límite, no se observa la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, como ocurre en mitocondrias Cos-7, sino una pérdida progresiva de la capacidad de



capturar  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de la presencia de CsA (figura 4.33). Este fenómeno es similar al que observamos en mitocondrias de cerebro (figura 4.21). De acuerdo con ello, el *swelling* (disminución de absorción) mitocondrial es menor que en células Cos-7 (figura 4.34). En cualquier caso, el número de adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarias para que empiece el *swelling* es mayor en mitocondrias control que en las SCaMC-1 *knock-down* en presencia, pero no en ausencia de ATP-Mg (figura 4.34).



**Figura 4.34. Hinchamiento en mitocondrias control y SCaMC-1 *knock-down* de células 143B después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ .** El swelling se midió siguiendo la absorbancia a 540 nm de la suspensión: **A)** en presencia de ATP-Mg 2 mM; **B)** en ausencia de nucleótidos de adenina; **C)** en presencia de ATP-Mg 2 mM y presencia o ausencia de RR 200 nM. Las mitocondrias control muestran una aparente contracción en presencia de ATP-Mg 2 mM que desaparece en presencia de RR, lo que sugiere que se debe a la formación de precipitados  $\text{Ca-Pi}$ .

Resultados

También es diferente el efecto de la CsA en las dos líneas celulares, Cos-7 y 143B. En las mitocondrias de células Cos-7 (figura 4.31B) podemos observar que la adición de CsA incrementa la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en mitocondrias control como en mitocondrias *knock-down*, y también inhibe el *swelling* mitocondrial (figura 4.32C). Sin embargo, las mitocondrias de células 143B no se ven prácticamente afectadas por la adición de CsA (figura 4.33B). No hemos observado diferencias en la expresión de CyP-D entre mitocondrias de ambas líneas celulares que pudieran explicar esta diferencia de comportamiento frente a la adición de CsA (figura 4.26). Otra diferencia entre ambas líneas es que en las mitocondrias de células 143B tanto el ATP como el ADP aumentan la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 4.33), mientras que en mitocondrias de células Cos-7 sólo lo hace el ATP (figura 4.31). En presencia de ADP, la captura de mitocondrias de células Cos-7 no captan  $\text{Ca}^{2+}$  de forma significativa (resultados no mostrados).

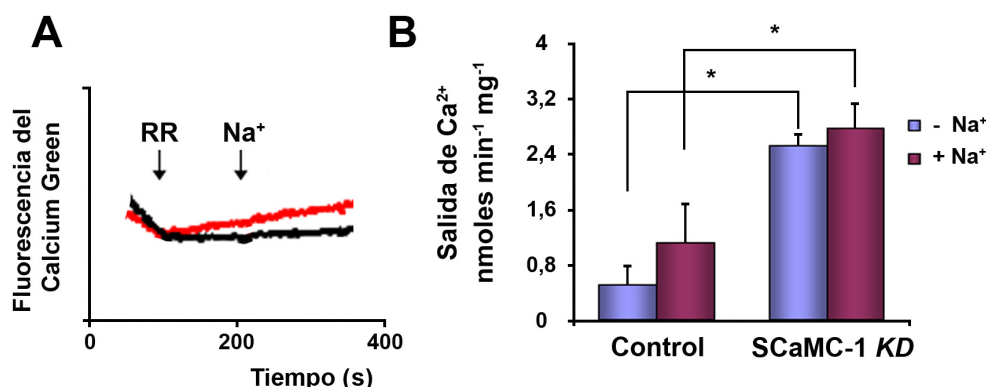
Curiosamente, a diferencia de mitocondrias de hígado, las mitocondrias de células Cos-7 y 143B muestran una aparente contracción (aumento de absorción a 540nm) cuando se añade  $\text{Ca}^{2+}$  al medio, antes de la apertura del PTP (figuras 4.32A y 4.34A). Algunos autores ya han observado previamente “contracción” mitocondrial (Kristian et al., 2002, 2007; Chalmers y Nicholls, 2003) y asumen que el aumento en absorbancia se debe a la formación de precipitados insolubles de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en la matriz mitocondrial que desvían los rayos de luz del espectrofotómetro. Otros autores (Valcarce et

al., 1988) han observado contracción mitocondrial al añadir nucleótidos de adenina a mitocondrias inmaduras de hígado. La adición de RR 200 nM a la cubeta con mitocondrias 143B elimina el aumento de absorbancia producido por el  $\text{Ca}^{2+}$  (figura 4.34B), lo que sugiere que realmente se debe a la formación de precipitados de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en la matriz. El aumento de absorbancia es mayor en mitocondrias control que en mitocondrias *knock-down* para SCaMC-1 (figuras 4.32A y 4.34A), lo que indicaría que SCaMC-1 favorece la formación de complejos de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en presencia de nucleótidos de adenina en el medio externo.

### 3.6) SCaMC-1 INTERVIENE EN EL TAMPONAMIENTO DEL $\text{Ca}^{2+}$ MITOCONDRIAL EN MITOCONDRIA AISLADA.

Nuestros resultados indican que SCaMC-1 podría modular la formación de complejos de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en la matriz mitocondrial, y por tanto modificar los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la mitocondria. Hemos estudiado los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  libres presentes en la matriz mitocondrial observando la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria después de inhibir el CaU con RR (Vitorica y Satrústegui, 1985). Cuando se inhibe el uniportador, se desenmascaran los sistemas de eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$ , que comienzan a expulsar el  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria, y la velocidad de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  depende de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la matriz (Vitorica y Satrústegui, 1985).

Después de cargar mitocondrias aisladas de células 143B control y SCaMC-1 *knock-down* con  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ATP-Mg 1 mM, se añadió RR. Se puede observar que la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto independiente como dependiente de  $\text{Na}^+$ , es mucho más rápida en mitocondrias de células SCaMC-1 *knock-down* que en mitocondrias control (figura 4.35). Este resultado sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre está más tamponado en la mitocondrias de células control. Esto podría ser debido a que los nucleótidos de adenina transportados por SCaMC-1 permiten la precipitación de Pi y  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial, como se había sugerido hace tiempo (Carafoli et al., 1965). Esto podría explicar por qué el PTP se abre antes en mitocondrias con menor expresión de SCaMC-1. Probablemente el  $\text{Ca}^{2+}$  libre se dispara por encima del umbral tolerado antes de la apertura del PTP en estas mitocondrias.



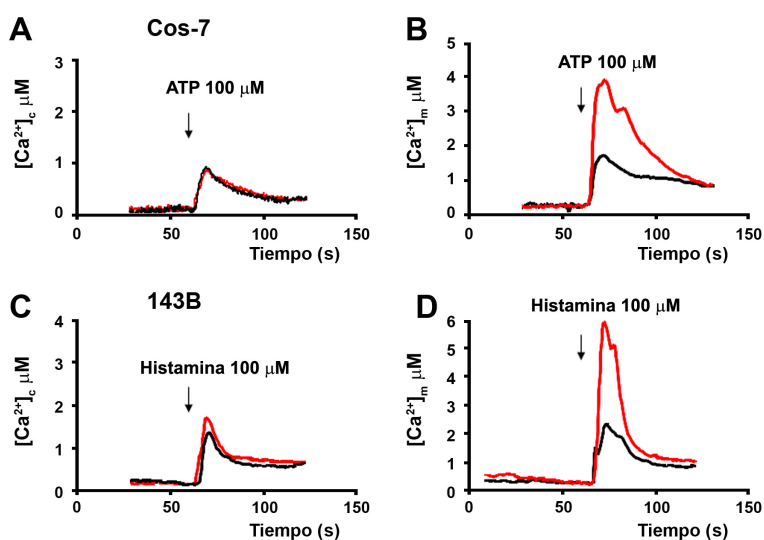
**Figura 4.35. Comparación de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias de células 143B control y SCaMC-1 *knock-down*.** A) Mitocondrias (0,25 mg/mL) control (línea negra) y SCaMC-1 *knock-down* (línea roja) se cargaron antes del ensayo con 320 nmoles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína en presencia de ATP-Mg 1 mM. Se añadió RR 200 nM para iniciar la salida de  $\text{Ca}^{2+}$ . Después se añadió NaCl 10 mM ( $\text{Na}^+$ ) para estimular el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . B) Velocidad de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  independiente de  $\text{Na}^+$  (-  $\text{Na}^+$ ) y dependiente de  $\text{Na}^+$  (+  $\text{Na}^+$ ). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  es mayor en células SCaMC-1 *knock-down*. El  $\text{Na}^+$  estimula la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  sólo muy ligeramente. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (\* =  $p < 0,05$ , prueba de la t de Student).

### 3.7) LA HOMEOSTASIS DEL $\text{Ca}^{2+}$ MITOCONDRIAL ESTÁ AFECTADA EN CÉLULAS SIN SCaMC-1.

Para determinar el efecto de la ausencia de SCaMC-1 en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula entera hemos medido los incrementos en  $\text{Ca}^{2+}$  libre provocados por agonistas, tanto en el citosol,  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  como en la mitocondria,  $[\text{Ca}^{2+}]_m$ . Para ello, hemos utilizado la proteína aequorina, en sus versiones mitocondrial y citosólica.

Después de reconstituir la sonda con su coenzima coelenterazina, las células Cos-7 se estimularon con ATP 100  $\mu\text{M}$ . El ATP actúa sobre receptores purinérgicos acoplados a proteínas G. Se produce IP<sub>3</sub>, que provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplásmico. Se produce un incremento en  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  (figura 4.36A) que es idéntico en células control y células *knock-down* para SCaMC-1 ( $0,87 \pm 0,26 \mu\text{M}$  y  $1,04 \pm 0,27 \mu\text{M}$  respectivamente, media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes).

La señal de  $\text{Ca}^{2+}$  generada en el citosol es transmitida a la mitocondria a través del CaU (figura 4.36B). Sin embargo, la señal mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  fue mucho mayor en células *knock-down* para SCaMC-1 que en células control ( $3,05 \pm 0,63 \mu\text{M}$  frente a  $1,07 \pm 0,40 \mu\text{M}$ , media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes,  $p < 0,05$ , prueba de la t de Student).

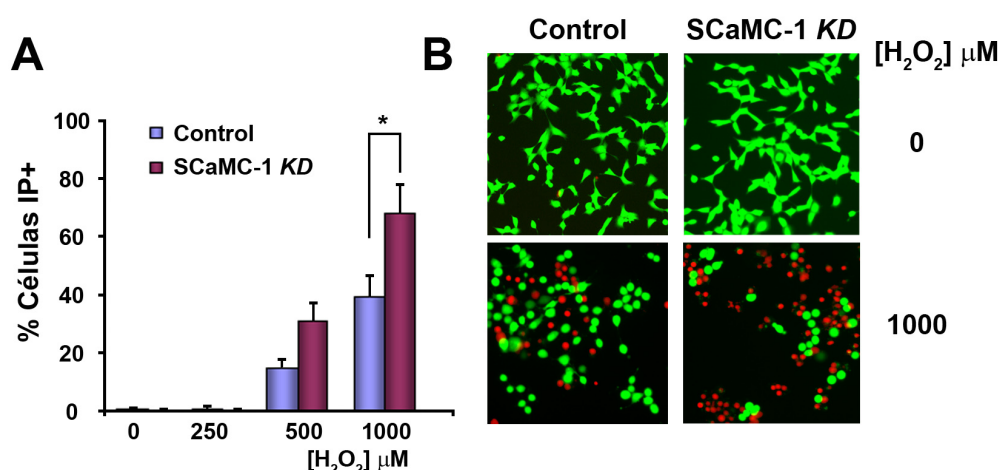


**Figura 4.36. Medida de la concentración  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol y mitocondria de células intactas en respuesta a la adición de agonistas.** Determinación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico o mitocondrial en respuesta a ATP en células Cos-7 (A, B) e histamina en células 143B (C, D) que expresan la sonda de calcio aequorina citosólica (A, C) o mitocondrial (B, D). Las líneas negras indican las células control, mientras que las líneas rojas indican las células SCaMC-1 *knock-down*.

Se obtuvieron resultados prácticamente idénticos en células 143B estimuladas con histamina 100  $\mu\text{M}$  (figura 4.36C-D). Como no se ha observado ningún efecto de la ausencia de SCaMC-1 en la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  por el uniportador en mitocondria aislada (Figs 4.31 y 4.33), estos resultados demuestran que el tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial en las células *knock-down* está afectado, y complementan los resultados obtenidos en mitocondria aislada.

## 3.8) SCaMC-1 MODULA LA APERTURA DEL PTP EN CÉLULAS.

El estrés oxidativo causado por  $H_2O_2$  causa la liberación de  $Ca^{2+}$  de los depósitos internos, y se ha descrito previamente que esto causa muerte necrótica dependiente de PTP (Baines et al., 2005; Schinzel et al., 2005). Para investigar si SCaMC-1 juega un papel en la modulación del PTP *in vivo* células 143B control y *knock-down* de SCaMC-1 se trataron con varias concentraciones de  $H_2O_2$  durante 6 horas y se determinó el porcentaje de células muertas con marcaje de yoduro de propidio, tanto por conteo al microscopio de fluorescencia (figura 4.37) como por citometría de flujo (resultados no mostrados). La figura 4.37 muestra que las células control son significativamente más resistentes al tratamiento con  $H_2O_2$  1000  $\mu M$  que las células *knock-down* de SCaMC-1. La muerte provocada por  $H_2O_2$  no se inhibe en presencia de CsA 5  $\mu M$ , lo que concuerda con que no se pudo inhibir la apertura del PTP en mitocondria aislada de células 143B en presencia de CsA (figura 4.33).



**Figura 4.37. Efecto de SCaMC-1 en la muerte celular inducida por  $H_2O_2$ .** Se trató células 143B control y SCaMC-1 *knock-down* con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  durante 6 horas. La muerte celular se evaluó por microscopia de fluorescencia cargando las células durante 15 minutos con calceína-AM 1  $\mu M$  (Molecular Probes) para marcar las células vivas (fluorescencia verde) y yoduro de propidio 2  $\mu M$  (IP) (Molecular Probes) para teñir los núcleos de las células muertas (fluorescencia roja). \* En A, Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 6 experimentos independientes. Se contaron 9 campos por condición en cada experimento. La diferencia entre células control y *knock-down* es significativa ( $p < 0,05$ , ANOVA de dos vías). El panel B muestra imágenes representativas (x40).

Este abordaje no se pudo realizar, sin embargo, en células Cos-7, ya que son hipersensibles al  $H_2O_2$  y se levantan de la placa en pocas horas, de modo que hemos empleado un método simple que permite inducir el PTP en células de manera que se puede estudiar directamente y a tiempo real (Duchen, 2000). Para ello hemos utilizado un indicador del potencial de membrana mitocondrial, como el TMRM, que actúa a la vez como generador de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como indicador del potencial de membrana. Hemos investigado la apertura del PTP inducida por ROS utilizando la iluminación del TMRM con láser de alta potencia (Duchen, 2000). La iluminación del TMRM genera superóxido, que lleva a la apertura del PTP. La figura 4.38 (A y E) muestra que las células control son capaces de resistir la exposición al láser de alta potencia durante todo el experimento (alrededor de una hora), mientras que las células *knock-down* son hipersensibles al láser y sus mitocondrias se despolarizan casi inmediatamente (figura 4.38B y E). En mitocondrias *knock-*

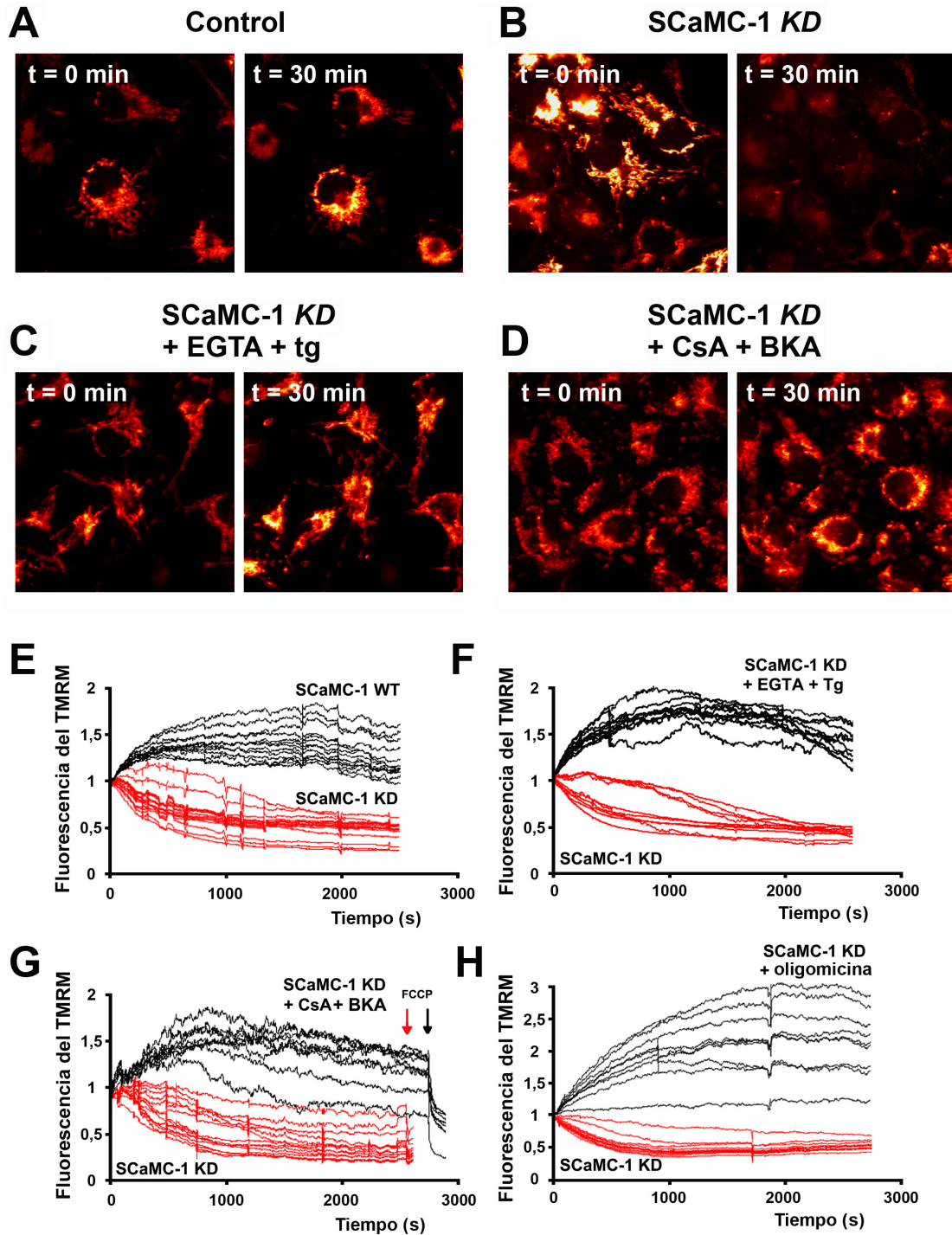
*down* la adición de FCCP al final del experimento no provoca prácticamente ningún efecto (figura 4.38G).

Para comprobar que la despolarización mitocondrial es dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, las células se incubaron con TMRM en un medio sin  $\text{Ca}^{2+}$  y con EGTA 100  $\mu\text{M}$ . Además, 10 minutos antes de la medida se añadió tapsigargina 1  $\mu\text{M}$  para vaciar los depósitos internos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este tratamiento previno la despolarización mitocondrial en las células SCaMC-1 *knock-down* (figura 4.38C y F), lo que sugiere que el  $\text{Ca}^{2+}$  es esencial en este proceso, como ya ha sido demostrado por otros grupos (Duchen et al., 1998).

Sorprendentemente, la CsA es incapaz de prevenir la despolarización mitocondrial. Sin embargo, debemos considerar que la CsA no inhibe completamente el PTP, sino que simplemente aumenta la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria (figuras 4.31 y 4.32). Es posible que en este experimento el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial sobrepase la capacidad de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  incluso en presencia de CsA. También hay que tener en cuenta que en la literatura hay resultados contradictorios sobre el papel de la CyP-D a la hora de inhibir la depolarización inducida por láser (Hüser et al., 1998; Minamikawa et al., 1999), al igual que para inhibir la muerte neuronal en situaciones de isquemia/reperfusión o excitotoxicidad del glutamato (Ruiz et al., 2000; Abramov y Duchen, 2008; Li et al., 2009). De todas formas, la combinación de dos inhibidores, CsA y BKA, sí consigue prevenir la despolarización mitocondrial en las células SCaMC-1 *knock-down* (figura 4.38D y G).

La oligomicina previno la despolarización mitocondrial, y causo, por el contrario, una hiperpolarización en ambas líneas celulares (figura 4.38H). La protección por oligomicina se puede explicar por 3 causas: 1) La oligomicina inhibe la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa mitocondrial, y por tanto se produce una acumulación de  $\text{H}^+$  en el espacio intermembrana. La hiperpolarización resultante inhibe la apertura del PTP, ya que el PTP es inhibido por alto potencial de membrana y estimulado por bajo potencial de membrana. Esta hipótesis implica que durante la iluminación del TMRM la  $\text{H}^+$ -ATP sintasa sigue funcionando en sentido de síntesis de ATP, algo que no parece ocurrir en otros tipos celulares (Duchen, 2000). 2) Otro estudio (Chavez et al., 2005) ha demostrado que la oligomicina es capaz de inhibir el PTP en mitocondria aislada, y se explicó por un aumento en la captura de Pi por la mitocondria a través del transportador  $\text{Pi}/\text{H}^+$ , al haber más  $\text{H}^+$  disponibles en el espacio intermembrana. El exceso de Pi produciría más tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre mitocondrial (Chavez et al., 2005). 3) También se ha visto que la oligomicina puede tener un efecto antioxidante (Marshansky, 1993).





**Figura 4.38. Efecto de SCaMC-1 en la apertura del PTP inducida por láser en células Cos-7.** Se iluminó con láser de alta potencia células Cos-7 control y SCaMC-1 *knock-down* cargadas con TMRM 100 nM y se monitorizó la pérdida de  $\Delta\Psi$  mitocondrial a lo largo del tiempo. **A y B)** Células control y SCaMC-1 *knock-down* respectivamente. **C y D)** Células *knock-down* tratadas con EGTA 100  $\mu$ M y tapsigargina 1  $\mu$ M o con CsA 5  $\mu$ M y BKA 50  $\mu$ M respectivamente. **E)** Comparación de la despolarización en células control (líneas negras) y *knock-down* (líneas rojas). Cada línea representa una célula. El  $\Delta\Psi$  es estable en las células control a lo largo del tiempo. **F-H)** Efecto de la adición de EGTA 100  $\mu$ M y tapsigargina 1  $\mu$ M (**F**), CsA 5  $\mu$ M y BKA 50  $\mu$ M (**G**) u oligomycin 1  $\mu$ M (**H**) en la despolarización de células *knock-down*. Las líneas negras indican células *knock-down* tratadas y las líneas rojas indican células *knock-down* no tratadas. En F, se añadió FCCP 1  $\mu$ M (flecha) al final del experimento para provocar la despolarización completa de la mitocondria. Se realizaron al menos 3 experimentos para cada condición y línea celular con resultados idénticos. Se muestran experimentos representativos.

Estos datos en su conjunto demuestran que el transportador de ATP-Mg/Pi modula también la apertura del PTP, y por tanto la muerte en células intactas. Probablemente, frente al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (parte del cual proviene del retículo) inducido por ROS, la SCaMC-1 se activa transportando ATP-Mg o ADP a la mitocondria, lo que aumenta la producción de complejos de Pi y  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria y ayuda a tamponar el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. En mitocondrias *knock-down* de SCaMC-1 se producirá un aumento mayor de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (como ya hemos visto al movilizar el  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando ATP o histamina como agonistas).





## Discusión

---



## DISCUSIÓN

### 1. FUNCIÓN DE LA S<sub>Ca</sub>MC EN LEVADURAS.

#### 1.1) Sal1p es el transportador de ATP-Mg/Pi en *Saccharomyces cerevisiae*.

A principios de los años 80 el grupo de Aprille identificó el transportador de ATP-Mg/Pi en mitocondrias de hígado de rata (Aprille, 1988, 1993). Este transportador sería el responsable del transporte y acumulación de nucleótidos de adenina en la mitocondria en las primeras horas de vida postnatal (Aprille y Asimakis, 1980). El transportador catalizaba el intercambio electroneutro de ATP-Mg<sup>2+</sup> por HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> o HADP<sup>2-</sup> por HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> entre el citosol y la matriz mitocondrial (Joyal y Aprille, 1992), y por tanto, era capaz de modular el contenido neto de nucleótidos de adenina (ATP + ADP + AMP). Además, el transporte era activado por Ca<sup>2+</sup> extramitocondrial en el rango de bajo micromolar (Haynes et al., 1986; Nosek et al., 1990).

En esta tesis hemos demostrado que Sal1p es el ortólogo del transportador de ATP-Mg/Pi en la levadura. La actividad de este transportador era completamente desconocida en este organismo, aunque el grupo de Kolarov había propuesto la existencia de algún tipo de transportador de nucleótidos de adenina en la mitocondria alternativo al AAC (Drgon et al., 1991). Sal1p no es esencial, y su ausencia no causa ningún defecto de crecimiento en ninguna de las situaciones estudiadas hasta ahora. Sólo es indispensable en ausencia de los AACs (Chen, 2004; Cavero et al., 2005). El grupo de Chen ha demostrado que el doble mutante *aac2Δ, sal1Δ* pierde el *DNA<sub>mit</sub>* (Kucejova et al., 2008). La pérdida del *DNA<sub>mit</sub>* es letal en células *aac2Δ*, ya que son incapaces de generar ΔΨ mitocondrial (ver el apartado 1.3).

Sal1p transporta tanto ATP como ADP y requiere Ca<sup>2+</sup> de manera estricta (figuras 4.7 y 4.10). Además, el transporte de ATP requiere Mg<sup>2+</sup>, mientras que el de ADP no, lo cual es coherente con los sustratos del transportador, ATP-Mg<sup>2+</sup> y HADP<sup>2-</sup> (Joyal y Aprille, 1992; Fiermonte et al., 2004). En el caso del transporte de ATP, Sal1p también funciona como transportador de Mg<sup>2+</sup> (Traba et al., 2008), aunque su actividad es mucho menor que la del canal mitocondrial de Mg<sup>2+</sup>, la proteína Mrs2p (Kolisek et al., 2003).

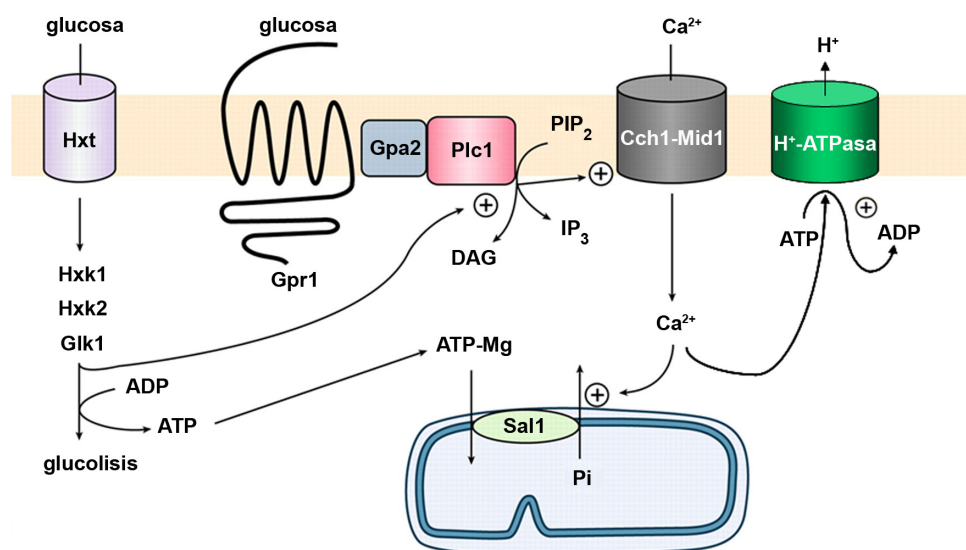
El Ca<sup>2+</sup> no modifica la K<sub>m</sub> del transportador, que es aproximadamente 0,2 mM para ambos nucleótidos, pero sí la V<sub>max</sub>, con un valor de S<sub>0,5</sub> de 15 μM (figura 4.8). La S<sub>0,5</sub> para Ca<sup>2+</sup> es más alta que en las S<sub>Ca</sub>MCs de mamíferos (ver el apartado 2.1 y Aprille, 1993). Esto no es sorprendente si tenemos en cuenta que en Sal1p sólo 2 de los 4 motivos EF son funcionales, mientras que todos lo son en los S<sub>Ca</sub>MCs de mamíferos (figura 4.1). Además, los motivos EF funcionan como parejas. Así, se produciría interacción entre los motivos EF1 (no funcional) y EF2 (funcional), y entre los motivos EF3 (funcional) y EF4 (no funcional). Asimismo, existe una inserción de 40 aminoácidos entre los motivos 3 y 4 (figura 4.1), lo que probablemente dificulta su interacción y reduce la afinidad por Ca<sup>2+</sup>. El requerimiento estricto de Ca<sup>2+</sup> para el funcionamiento del transporte ya había sido observado previamente en el transportador de hígado (Haynes et al., 1986; Nosek et al., 1990), aunque no en el transportador reconstituido en proteoliposomas (Fiermonte et al., 2004), y contrasta con el requerimiento de Ca<sup>2+</sup> de los otros transportadores mitocondriales con dominios de unión a Ca<sup>2+</sup>, los

AGCs. Aralar y citrina requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para activarse, pero tienen actividad basal incluso en ausencia del catión (Pardo et al., 2006; Contreras et al., 2007). Aralar se activa 3 veces con concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  saturantes, mientras que citrina se activa sólo 1,5 veces (Contreras et al., 2007). Esto sugiere que el mecanismo de activación podría ser diferente entre los dos tipos de transportadores, AGCs y SCaMCs. La diferente estructura del dominio N-terminal de ambos grupos podría explicar estas diferencias. El dominio N-terminal de Sal1p y las SCaMC es muy similar en estructura y secuencia a la calmodulina (del Arco y Satrústegui, 2004; Caverio et al., 2005), mientras que el de los AGC, que tiene unos 8 ó 9 motivos EF, no lo es (Contreras et al., 2007). Se ha sugerido que las SCaMC provienen de la fusión de un transportador de nucleótidos primitivo con una calmodulina (del Arco y Satrústegui, 2005).

Sal1p es el primer mecanismo identificado de regulación por  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria de *S. cerevisiae*. Esta levadura es una excepción en cuanto a la señalización por  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria. Carece del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli et al., 1970) y las deshidrogenasas mitocondriales son insensibles al ion (Nichols et al., 1994). Además, el AGC de la levadura, Agc1p, no posee motivos EF en su larga extensión N-terminal (Caverio et al., 2003). Por otro lado, recientemente ha sido identificada una proteína denominada Gem1p, con dominios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo *EF-hand*, que pertenece a la familia de las GTPasas y que se localiza en la membrana mitocondrial externa (Frederick et al., 2004). Sus ortólogos en mamíferos, denominados Miro GTPasas, están implicados en el control mediado por  $\text{Ca}^{2+}$  de la movilidad de la mitocondria (Saotome et al., 2008; Macaskill et al., 2009; Wang y Schwarz, 2009), por lo que su función en levadura podría ser similar.

## 1.2) Función fisiológica de Sal1p (1): señalización por calcio en células en ayuno.

En *S. cerevisiae* se conocen varios eventos que producen señales citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$ : exposición a glucosa en células en fase estacionaria, estrés alcalino y exposición a feromona alfa entre otros (Viladevall et al., 2004; Nakajima-Shimada et al., 1991). Nuestros resultados sugieren que Sal1p podría ser una diana de la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glucosa en células en fase estacionaria tras un ayuno (figura 4.14). La señalización por glucosa en levadura es requerida para ajustar el crecimiento y el metabolismo al tipo y cantidad de fuente de carbono disponible. La detección de glucosa en la levadura inicia una cascada de transducción similar a la empleada en mamíferos para las hormonas, en la que se producen AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$  como segundos mensajeros tempranos (Rolland et al., 2002). La glucosa se une a un receptor acoplado a proteínas G (Gpr1p). La proteína  $\text{G}\alpha$  Gpa2p actúa como activador de la adenilato ciclasa, lo que produce un aumento de los niveles de AMPc. El mismo complejo receptor-proteína G parece activar a la fosfolipasa C. Se produce un aumento de IP3 que desencadena un aumento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (figura 5.1). Sin embargo, a diferencia de las células de mamífero, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  proviene sobre todo del exterior de la célula, a través del canal Cch1p/Mid1p, y no de los depósitos internos (Tisi et al., 2002, 2004). Para que se produzcan los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  y de AMPc es necesaria la entrada y fosforilación de la glucosa (Tökés-Füzesi et al., 2002). Las dianas de esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  eran hasta hace poco desconocidas pero recientemente se ha identificado la  $\text{H}^+$ -ATPasa de la membrana plasmática como la primera diana de esta señal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Trópia et al., 2006).



**Figura 5.1. Papel de Sal1p en la señalización por calcio inducida por glucosa en *Saccharomyces cerevisiae*.** La adición de glucosa a células en ayuno provoca la activación de un receptor (Gpr1) acoplado a proteína Gα (Gpa2). Plc1, la fosfolipasa C, hidroliza el fosfatidil inositol (PIP<sub>2</sub>) y genera IP<sub>3</sub>, que actúa como segundo mensajero abriendo el canal de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (Cch1-Mid1). La activación completa de esta vía requiere además la entrada de la glucosa a través de los transportadores de hexosas (Hxt) y su fosforilación por la hexoquinasa (Hxk1 o Hxk2) o glucoquinasa (Glk1). La señal de Ca<sup>2+</sup> activa a la H<sup>+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática y también a Sal1p. La activación de Sal1p produce la entrada de ATP a la mitocondria. Modificado de Satrústegui et al., 2007.

Las señales inductoras de crecimiento tras la adición de glucosa a células en fase estacionaria son desconocidas. Una de dichas señales podría ser el ATP, ya que es un producto de la glucólisis. Sin embargo, las levaduras en fase estacionaria contienen aún niveles de ATP de alrededor de 1 mM (Gillies et al, 1981; Navon et al, 1979). Nuestra hipótesis es que una de las señales que permiten la proliferación no es el ATP citosólico, sino el mitocondrial. Nuestros datos demuestran que la señal de Ca<sup>2+</sup> producida por glucosa en células en fase estacionaria también activa el transporte a través de Sal1p (figura 5.1 y 4.14). La activación de Sal1p provoca un aumento en los niveles de ATP mitocondrial. La S<sub>0.5</sub> para Ca<sup>2+</sup> de Sal1p, en torno a 15 μM, podría parecer demasiado alta comparada con las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico medidas después de la adición de glucosa a células en ayuno (alrededor de 5-6 μM; Tisi et al., 2004). Sin embargo, hay que tener en cuenta que, al igual que ocurre en células animales, es posible que la concentración real de Ca<sup>2+</sup> en el entorno de las mitocondrias sea mayor, debido a la formación de microdominios de altas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> en puntos de contacto entre la mitocondria y la membrana plasmática. Además, hay grandes diferencias en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> citosólico medidas en diferentes laboratorios (Tisi et al., 2004; Tökés-Füzesi et al., 2002). Por otro lado, este aumento inmediato de ATP mitocondrial no es esencial para el crecimiento en glucosa, ya que la ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio o la ausencia de Sal1p, no afectan el crecimiento en glucosa siempre que los AACs estén presentes (Cavero et al., 2005). Hemos demostrado que los AACs (básicamente Aac2p) son capaces de funcionar para importar ATP (intercambiándolo con ADP mitocondrial o con pirofosfato (PPi), figura 4.12), incluso cuando las mitocondrias están respirando, como es el caso de las células en ayuno (Lagunas, 1976). Probablemente, el aumento a largo plazo de la razón ATP/ADP citosólica inducido por glucosa puede facilitar el importe de ATP a través de Aac2p y compensar la ausencia de Sal1p.

Con los datos de que disponemos podemos concluir que hay dos sistemas de transporte de nucleótidos a la mitocondria. Por un lado los tres AACs (Aac1p, Aac2p, Aac3p, de las cuales la isoforma 2 es la principal) y por otro Sal1p. Cuando los AACs son funcionales Sal1p podría ser redundante, y por tanto la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glucosa innecesaria. Esto explicaría por qué la cepa *sal1Δ* es viable, y no presenta ningún fenotipo de crecimiento en ninguna de las situaciones estudiadas. También explica el hecho de que muchas de las cepas utilizadas habitualmente en el laboratorio presentan una mutación en el gen *SALI*, que produce una proteína truncada no funcional, y no presentan ningún fenotipo aparente (Zúniga et al., 1999; Chen, 2004). Sin embargo, en levaduras carentes de AACs, en las cuales el único sistema de transporte de ATP es Sal1p, la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  sí es requerida. De hecho, Chen comprobó que la mutación de los motivos EF de Sal1p en una levadura que carece de AACs genera una levadura que no es viable en glucosa (Chen, 2004), lo que refuerza la hipótesis de que dicha señal de  $\text{Ca}^{2+}$  es necesaria.

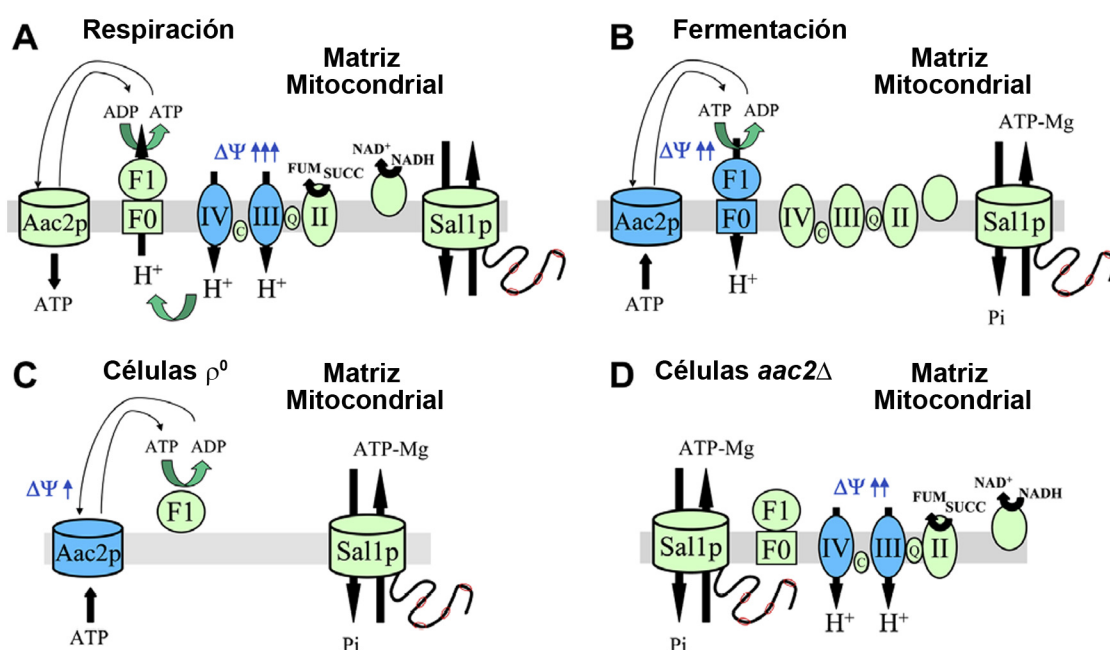
### 1.3) Función fisiológica de Sal1p (2): crecimiento exponencial en glucosa.

La mitocondria en condiciones normales funciona sintetizando ATP por fosforilación oxidativa utilizando la fuerza protón-motriz generada por respiración. Sin embargo, la mitocondria de la levadura en anaerobiosis o en células que carecen de  $\text{DNA}_{\text{mit}}$  se convierte en consumidora de ATP, debido a que la F1-ATPasa mitocondrial funciona en sentido reverso (Chen y Clark-Walker, 1999; Clark-Walker y Chen, 2001; Lefebvre-Legendre et al., 2003; Clark-Walker, 2003). El mismo fenómeno se observa en algunos estadios del ciclo vital de ciertos parásitos como el tripanosoma (Schnauffer et al., 2005) o en organismos facultativos en anerobiosis (St-Pierre et al., 2000). También en estos casos la mitocondria se convierte en consumidora de ATP.

Nuestros datos sugieren que tanto Aac2p como Sal1p suministran ATP citosólico a la mitocondria también en crecimiento aeróbico en glucosa (figura 4.17). Chen denominó función V (por viabilidad) a esta nueva función del AAC y de Sal1p, en contraposición con la función R (por respiración), que es la función respiratoria típica de los AACs (Chen, 2004). Sal1p es capaz de mantener los niveles de ATP mitocondrial incluso cuando Aac2p es inhibida (figura 4.17), lo que explicaría por qué los mutantes en los AACs son viables cuando crecen en glucosa en aerobiosis (Drgon et al., 1991; Chen, 2004; Cavero et al., 2005). Debido a que Sal1p es estrictamente dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , debe haber señales de  $\text{Ca}^{2+}$  a lo largo del ciclo celular durante el crecimiento exponencial en glucosa.

El ATP en la matriz mitocondrial es esencial para el importe y ensamblaje de proteínas mitocondriales (Rehling et al., 2004) y para la síntesis de centros de S-Fe (Lill y Mühlenhoff, 2008). Estos dos procesos son las únicas funciones indispensables de la mitocondria para que la célula de levadura sobreviva (Baker y Schatz, 1991). Además de ATP, estos dos procesos también requieren para funcionar correctamente la presencia de  $\Delta\Psi$  mitocondrial. En levaduras que respiran, el potencial de membrana mitocondrial es generado por el bombeo de protones en los complejos respiratorios y el ATP es generado por fosforilación oxidativa, como se muestra en el esquema de la figura 5.2A. Este ATP mitocondrial es exportado al citosol en intercambio por ADP citosólico a través del AAC. Sin embargo, en levaduras que crecen utilizando glucosa en aerobiosis o anaerobiosis (figura 5.2B), o en células  $\rho^0$  sin  $\text{DNA}_{\text{mit}}$  (figura 5.2C), el ATP se importa del citosol, y el  $\Delta\Psi$  es generado por el intercambio electrogénico de ATP citosólico por ADP mitocondrial a través del AAC funcionando

en sentido reverso. El ATP tiene 4 cargas negativas, mientras que el ADP tiene 3, por lo que la entrada de ATP proporciona una carga negativa a la matriz mitocondrial. El ATP se hidroliza en la mitocondria a través de la  $H^+$ -ATP sintasa (con el consiguiente bombeo de protones, lo que también contribuye a la generación de  $\Delta\Psi$ ) o a través del fragmento F1-ATPasa (sin bombeo de protones) en levaduras  $\rho^0$  (Gbelská et al., 1983; Dupont et al., 1985; Lefebvre-Legendre et al., 2003). El grupo de Thorsness (Smith y Thorsness, 2008) ha propuesto que Aac2p y Aac3p son capaces de funcionar al revés para importar ATP, mientras que Aac1p sería menos eficiente. Sal1p es una fuente adicional de ATP cuando la levadura crece en glucosa, pero no contribuye a la generación de  $\Delta\Psi$  mitocondrial, ya que su intercambio es electroneutro, a diferencia del intercambio a través del AAC (Traba et al., 2009b), y es dispensable en estas condiciones. Por tanto, en anerobiosis y en células  $\rho^0$ , al no haber respiración, el AAC (básicamente Aac2p) se vuelve esencial, ya que es la única manera de generar  $\Delta\Psi$  (Traba et al., 2009b). Finalmente, en células sin AAC, Sal1p es esencial, ya que es la única manera de transportar ATP a la mitocondria, y también es esencial la cadena respiratoria, ya que es la única manera de generar  $\Delta\Psi$  en ausencia del AAC (figura 5.2D). Por esa razón las células *aac2 $\Delta$*  no pueden perder el *DNA<sub>mit</sub>* (Chen y Clark-Walker, 1999).

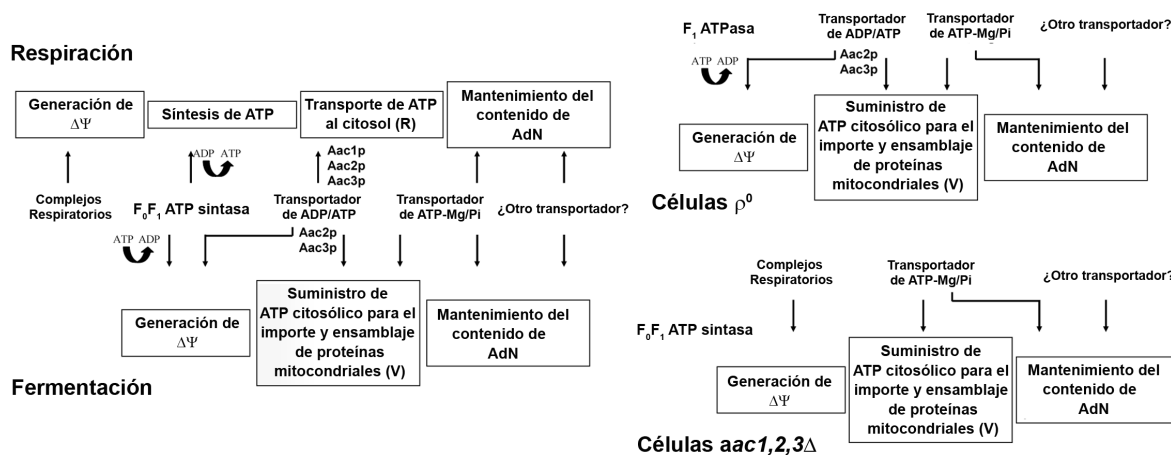


**Figura 5.2. Las células de levadura necesitan ATP mitocondrial y  $\Delta\Psi$  para sobrevivir.** Se marcan en azul los componentes mitocondriales responsables de generar el  $\Delta\Psi$  en cada panel. **A)** En levaduras en respiración, las células generan el  $\Delta\Psi$  por bombeo de  $H^+$  en la cadena respiratoria y sintetizan ATP a través de la  $H^+$ -ATP sintasa. El ATP es exportado al citosol a través del AAC (función R). Sal1p funcionaría para llenar la mitocondria de *AdN* para evitar la dilución de los mismos con la proliferación mitocondrial, pero es dispensable. **B)** En levaduras en fermentación, las células generan el  $\Delta\Psi$  mediante intercambio electrogénico de ATP citosólico (con 4 cargas negativas) por ADP mitocondrial (con 3 cargas negativas). La  $H^+$ -ATP sintasa funciona como ATPasa hidrolizando ATP y colabora en la generación del  $\Delta\Psi$  por bombeo de  $H^+$ . El ATP es proporcionado por el AAC en este proceso (función V), y Sal1p también colabora, pero es dispensable. **C)** En células sin DNAm<sub>it</sub> ( $\rho^0$ ), el fragmento  $F_0$  de la  $H^+$ -ATP sintasa no está presente, ya que es codificado por el genoma mitocondrial, y por tanto el  $\Delta\Psi$  sólo es generado por el AAC funcionando en reverso. El fragmento  $F_1$  es fundamental para mantener el intercambio electrogénico. **D)** En células sin AAC, el ATP se importa a través de Sal1p (función V), y el  $\Delta\Psi$  se genera por bombeo de  $H^+$  en la cadena respiratoria. Ambos sistemas se vuelven esenciales. Modificado de Traba et al., 2009b.



La pérdida simultánea de Aac2p y Sal1p provoca la pérdida del  $DNA_{mit}$ , y por tanto la muerte de las células (Kucejova et al., 2008). Parece que la pérdida del importe de ATP por la carencia de ambos sistemas provoca rápidamente defectos en la traducción de proteínas en la mitocondria, lo que desestabiliza el  $DNA_{mit}$ . La ausencia de Sal1p puede provocar defectos en el  $DNA_{mit}$ , incluso en presencia de Aac2p (Smith y Thorsness, 2008; Dimitrov et al., 2009). El grupo de Thorsness descubrió que el porcentaje de pérdida espontánea de  $DNA_{mit}$  aumenta de 1 % a 10 % en ausencia de *SAL1* en la cepa D273-10B (Smith y Thorsness, 2008), mientras que el grupo de Gottschling descubrió que *SAL1* era uno de los genes implicados en la alta tasa de pérdida de  $DNA_{mit}$  de la cepa S288C, de manera que mutaciones en *SAL1* aumentan esa tasa de 26 % a 79 % (Dimitrov et al., 2009). Por tanto, la pérdida de Sal1p debe provocar una disminución del aporte de ATP a la mitocondria, lo que provocará en determinadas situaciones fallos en el importe de proteínas, fundamentales para mantener y replicar el  $DNA_{mit}$ .

Como resumen, la figura 5.3 muestra la interacción funcional entre AACs, Sal1p y otros componentes mitocondriales.



**Figura 5.3.** Interacción funcional entre los AAC, Sal1p y otros componentes mitocondriales para generar ATP mitocondrial y  $\Delta\Psi$  en levaduras control (en respiración o en fermentación), o en levaduras que carecen de  $DNA$  mitocondrial o de AACs. Modificado de Traba et al., 2009b.

Algunos organismos eucariotas que carecen de mitocondrias poseen otros orgánulos denominados hidrogenosomas o mitosomas. Estos orgánulos tienen su origen en mitocondrias degeneradas, aunque carecen de la cadena de transporte electrónico y de la  $H^+$ -ATP sintasa. Sin embargo, suelen contener un solo transportador mitocondrial que proporciona ATP para las chaperonas, los sistemas de importe de proteínas y otras reacciones que lo necesiten (Voncken et al., 2002; van der Giezen et al., 2002; Chan et al., 2005; Stechmann et al., 2008; Hampl et al., 2008). Esta función es similar a la que proponemos para Sal1p, y de hecho, el transportador de alguno de estos organismos es más parecido evolutivamente a los transportadores de ATP-Mg/Pi (excepto por la ausencia del extremo N-terminal con dominios de unión a  $Ca^{2+}$ ) que a los AACs (del Arco y Satrústegui, 2005; Satrústegui et al., 2007).



## 2) FUNCIÓN DE LAS S<sub>Ca</sub>MCs EN MAMÍFEROS.

2.1) S<sub>Ca</sub>MC-1 y S<sub>Ca</sub>MC-3 son los transportadores de ATP-Mg/Pi presentes, respectivamente, en líneas celulares y tejidos (cerebro e hígado).

El grupo de Ferdinando Palmieri caracterizó la actividad transportadora de los transportadores humanos SLC25A24 y SLC25A23, a los que denominó APC-1 y APC-2 (ATP-Mg/Pi Carrier). Para ello utilizó ensayos en proteoliposomas, y descubrió que estas proteínas catalizaban el intercambio electroneutro de ATP-Mg y ADP por Pi (Fiermonte et al., 2004). Además descubrió un tercer parólogo, SLC25A25, al que denominó APC-3, pero fue incapaz de detectar su actividad transportadora. Tampoco fue capaz de demostrar dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en ninguna de las tres proteínas. Al mismo tiempo, en nuestro laboratorio se descubrieron las mismas proteínas, a las que denominamos S<sub>Ca</sub>MC-1 (APC-1)/SLC24A24, S<sub>Ca</sub>MC-2 (APC-3)/SLC25A25 y S<sub>Ca</sub>MC-3 (APC-2)/SLC25A23 (del Arco y Satrústegui, 2004), y más recientemente un cuarto parólogo, S<sub>Ca</sub>MC-3-like/SLC25A41 (Traba et al., 2009a). Además, se encontraron distintas isoformas para cada parólogo, generadas por utilización de exon 1 alternativo en el caso de S<sub>Ca</sub>MC-1 (dando lugar a la isoforma general S<sub>Ca</sub>MC-1 o a la isoforma específica de testículo S<sub>Ca</sub>MC-1a, Satrústegui et al., 2007) y S<sub>Ca</sub>MC-2 (dando lugar a las isoformas S<sub>Ca</sub>MC-2a, -2b, -2c y -2d, del Arco y Satrústegui, 2004) o bien por splicing alternativo en el extremo carboxilo terminal en el caso de S<sub>Ca</sub>MC-3 (dando lugar a la isoforma normal S<sub>Ca</sub>MC-3a y a las variantes truncadas S<sub>Ca</sub>MC-3b, -3c, -3d/e, que carecen del último segmento transmembrana, del Arco, 2005).

En esta tesis hemos estudiado la actividad transportadora de S<sub>Ca</sub>MC-1 y S<sub>Ca</sub>MC-3 utilizando mitocondrias obtenidas de líneas celulares y mitocondrias de hígado de ratón, respectivamente. S<sub>Ca</sub>MC-1 es la isoforma mayoritaria en las líneas celulares utilizadas (figura 4.26), y S<sub>Ca</sub>MC-3 es la isoforma mayoritaria en cerebro e hígado de ratón (figura 4.18). Nuestros resultados en mitocondrias de hígado de ratón demuestran que S<sub>Ca</sub>MC-3 es probablemente el transportador de ATP-Mg/Pi identificado por el grupo de Aprille en hígado de rata (Aprille, 1988, 1993). En mitocondrias de hígado del ratón KO para S<sub>Ca</sub>MC-3 no hay transporte neto de nucleótidos de adenina (figura 4.19A). En mitocondrias controles el transporte neto de nucleótidos de adenina depende de  $\text{Ca}^{2+}$  en un rango micromolar bajo, con una  $S_{0.5}$  de 3,4  $\mu\text{M}$  (figura 4.19B), lo cual es similar a lo encontrado en el transportador de ATP-Mg/Pi de hígado de rata (Aprille, 1988, 1993; Nosek et al., 1990). Por otro lado, las mitocondrias de líneas celulares también presentan este mecanismo. El transporte de ATP insensible a CAT en mitocondrias aisladas de células Cos-7 se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  también en un rango micromolar bajo, con una  $S_{0.5}$  de 12,7  $\mu\text{M}$  (figura 4.30)

La  $S_{0.5}$  para  $\text{Ca}^{2+}$  de ambos transportadores está por encima de la de los transportadores de aspartato/glutamato, AGCs, que es de 100-300 nM aproximadamente. Los AGCs se activan por señales pequeñas de  $\text{Ca}^{2+}$  que no llegan a entrar en la matriz mitocondrial (Pardo et al., 2006; Contreras et al., 2007). Por otro lado, las S<sub>Ca</sub>MC de mamíferos (al menos S<sub>Ca</sub>MC-1 y S<sub>Ca</sub>MC-3) se activan por señales de  $\text{Ca}^{2+}$  mayores que sí pueden llegar a entrar en la mitocondria ( $S_{0.5}$  del uniportador de  $\text{Ca}^{2+} \approx 10\text{-}20 \mu\text{M}$ ). Por tanto, las señales grandes de  $\text{Ca}^{2+}$  entrarán en la mitocondria y estimularán las deshidrogenas mitocondriales y por tanto la síntesis de ATP, y al mismo tiempo provocarán un aumento en el contenido total de nucleótidos de adenina de la mitocondria. Nuestro siguiente

objetivo será comprobar si ese aumento en el contenido total de nucleótidos de adenina tiene algún efecto en la propia síntesis de ATP, velocidad de respiración y otras reacciones *in vivo*. Por ejemplo, estudios de Balaban han demostrado que la  $H^+$ -ATP sintasa mitocondrial se activa por  $Ca^{2+}$  en el corazón (Balaban, 2009), aunque no se conoce el mecanismo. Una posibilidad es que en realidad su actividad se esté estimulando por un aumento en la disponibilidad de sus sustratos, que son los nucleótidos de adenina. Sin embargo, las SCaMCs parecen no estar presentes en mitocondrias de corazón, pero un mecanismo similar podría funcionar en otros tejidos.

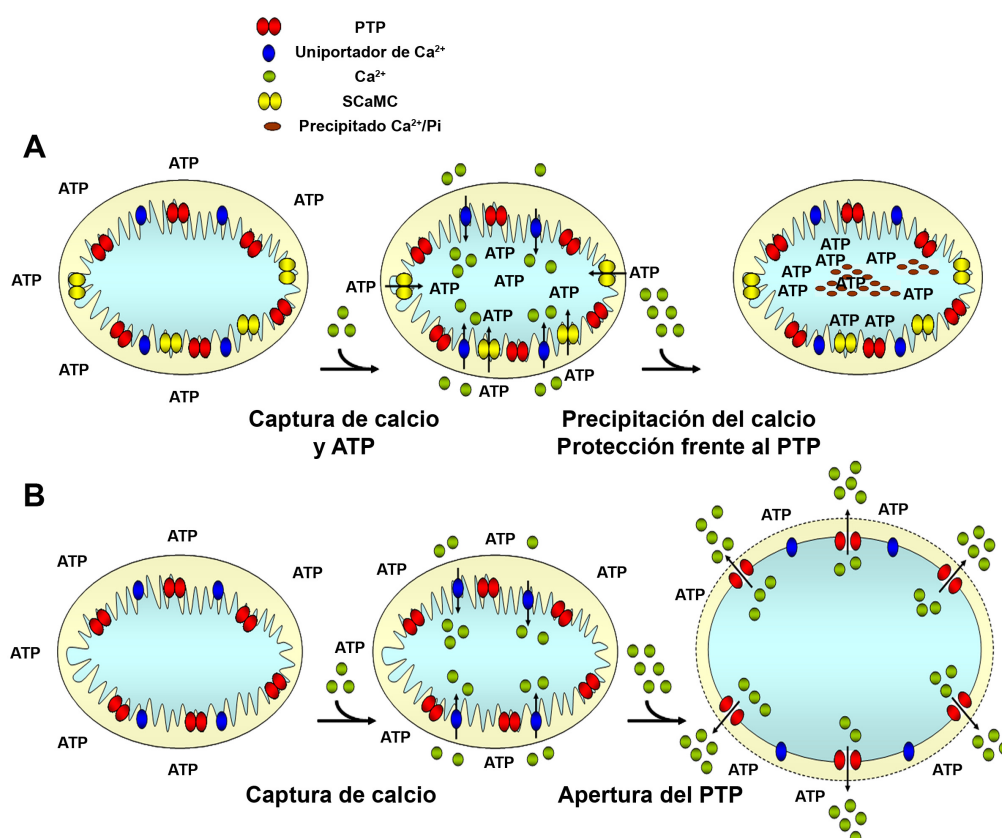
También es interesante demostrar la posible implicación de SCaMC-3 en el llenado postnatal de nucleótidos de adenina en la mitocondria de hígado. El grupo de Aprille demostró que el transportador de ATP-Mg/Pi era importante para la maduración mitocondrial del hígado de rata después del nacimiento, ya que el contenido neto de nucleótidos de adenina aumentaba varias veces en las 3 primeras horas tras el nacimiento, y ese aumento era fundamental para la maduración de la respiración mitocondrial y otros procesos mitocondriales (Aprille y Asimakis, 1980). El hecho de que SCaMC-3 sea la isoforma mayoritaria en hígado de ratón sugiere que esta isoforma sería responsable del llenado postnatal y sus efectos en la función mitocondrial.

## 2.2) Los transportadores de ATP-Mg/Pi son un nuevo mecanismo de regulación del PTP.

La mayoría de los experimentos que se han hecho para estudiar el PTP en mitocondria aislada se han realizado en condiciones no fisiológicas, como es la ausencia total de nucleótidos de adenina en el medio externo. En estas condiciones es muy sencillo provocar la apertura del PTP y observar el hinchamiento de las mitocondrias al añadir pequeñas cantidades de  $Ca^{2+}$  (Nicholls y Chalmers, 2004). En aquellos ensayos en los que sí se han utilizado nucleótidos de adenina, normalmente se utiliza una concentración de ADP inferior a la fisiológica (alrededor de 100  $\mu M$ ; Kokoszka et al., 2004; Basso et al., 2005). Sin embargo, son pocos los ensayos en los que se han utilizado concentraciones de nucleótidos más cercanas a las presentes en el citosol de la célula (Halestrap et al., 1997; Hagen et al., 2003; Chávez et al., 2005; Gizatullina et al., 2005), debido por un lado a que unen  $Ca^{2+}$ , y por ello interfieren en el ensayo, y porque desde los años 80 se consideraba que la gran capacidad de acumulación de  $Ca^{2+}$  (*massive loading*) en presencia de altos niveles de nucleótidos de adenina (Carafoli, et al 1965) era poco fisiológica.

En esta tesis hemos demostrado, utilizando dos modelos distintos de falta de función para dos de los parálogos, SCaMC-1 y SCaMC-3, en mitocondrias de líneas celulares y en mitocondrias de tejidos respectivamente, que el transportador de ATP-Mg/Pi es un regulador de la apertura del PTP. La importancia de este transportador se basa en que puede modificar el contenido de nucleótidos de adenina de la matriz mitocondrial, y numerosos estudios han demostrado que este parámetro regula la apertura del PTP (Hagen et al., 2003; Lapidus y Sokolove, 1993; Zoratti y Szabò, 1995). Mitocondrias con un alto contenido de nucleótidos de adenina son más resistentes frente a la apertura del PTP, mientras que mitocondrias vacías sufren apertura del PTP de forma espontánea, incluso en ausencia de  $Ca^{2+}$  (Hagen et al., 2003; Lapidus y Sokolove, 1993). La  $S_{0.5}$  para  $Ca^{2+}$  de estos transportadores es adecuada para responder a los aumento de la concentración de  $Ca^{2+}$  que son transmitidos a la mitocondria a través del CaU. Cuando el uniportador se activa ( $Ca^{2+} \approx 10-20 \mu M$ ), las SCaMCs funcionarían prácticamente a  $V_{max}$ .

El mecanismo por el cual los nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial protegen de la apertura del PTP no está claro. Nuestros datos sugieren, sin embargo, que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la matriz mitocondrial de mitocondrias repletas de nucleótidos es más baja que en mitocondrias vacías (figura 4.35). Estos datos indican, por tanto, que los nucleótidos de adenina de alguna manera permiten el tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial. Muchos autores han sugerido que en la mitocondria el  $\text{Ca}^{2+}$  se une al Pi y forma precipitados de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  amorfo (Chalmers y Nicholls, 2003; Kristian et al., 2002, 2007). Dichos precipitados pueden observarse perfectamente al microscopio electrónico (Greenawalt et al., 1964) y por microanálisis por rayos X (Kristian et al., 2007; Stanika et al., 2009). También se ha observado que un aumento en la proporción de mitocondrias que acumulan esos precipitados de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi se correlaciona con una mayor supervivencia frente a estímulos tóxicos, como el glutamato, en neuronas primarias (Pivovarova et al., 2008). Carafoli ha sugerido que los nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial favorecen la precipitación del Pi y el  $\text{Ca}^{2+}$  (Carafoli et al., 1965; Carafoli, 2003) y además se ha demostrado que dichos precipitados contienen nucleótidos de adenina en su composición (Weinbach y von Brand, 1965). Curiosamente, los precipitados de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en la matriz contienen además  $\text{Mg}^{2+}$  cuando las mitocondrias se cargan de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ATP, pero no cuando se cargan de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de ADP (Kristian et al., 2007), lo que concuerda con los sustratos transportados por las SCaMCs, ATP-Mg y ADP. El modelo que hemos propuesto se muestra en la figura 5.4.



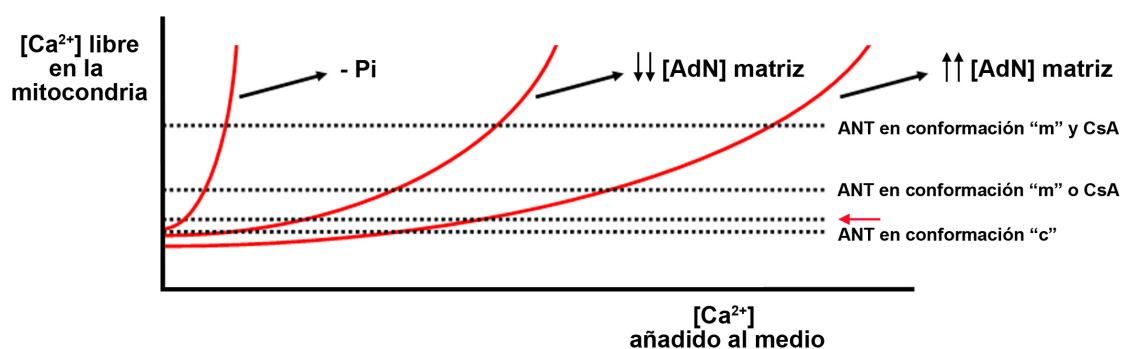
**Figura 5.4. Los nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial protegen frente a la apertura del PTP. A)** Cuando se añade  $\text{Ca}^{2+}$  a las mitocondrias, éste entra a través del uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y además estimula la actividad de la SCaMC, por lo que el ATP también entra. Los nucleótidos de adenina ayudan a que se formen los precipitados  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  en la matriz mitocondrial, por lo que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre disminuye en la matriz. **B)** En caso de que no haya SCaMC, el  $\text{Ca}^{2+}$  entra en la mitocondria, pero el ATP no. Por tanto, se producen menos precipitados  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  en la matriz, por lo que la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre aumenta y desencadena la apertura del PTP.

### 2.3) Modelo de la regulación de la capacidad de tamponamiento de $\text{Ca}^{2+}$ de la mitocondria de mamífero.

Los datos de que disponemos nos permiten proponer un modelo de cómo se regula el  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la matriz mitocondrial, y cómo se regula la sensibilidad del PTP en la mitocondria (figura 5.5). El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial parece ser el principal requerimiento para la apertura del PTP (Baumgartner et al., 2009). Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  libre alcanza un determinado umbral en la matriz mitocondrial se produce la apertura del PTP. La inhibición de la CyP-D por CsA, o su ausencia, hace más alto ese umbral. Sin embargo, el  $\text{Ca}^{2+}$  puede unirse al fosfato en la matriz y dar lugar a precipitados insolubles osmóticamente inactivos, lo que disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre (Chalmers y Nicholls, 2003). La inhibición de la CyP-D aumenta el umbral de captura de  $\text{Ca}^{2+}$  sin modificar la estabilidad de los complejos  $\text{Ca}^{2+}$ -Pi (Chalmers y Nicholls, 2003).

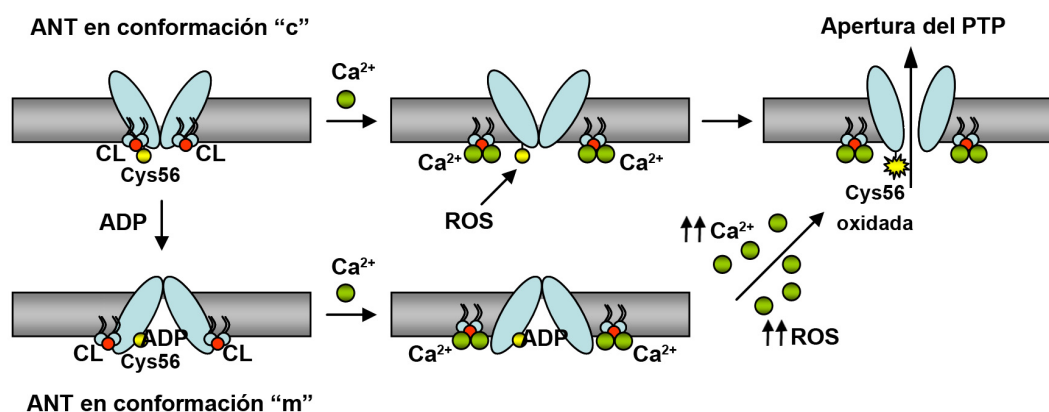
De acuerdo con esto, la capacidad de tamponar el  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria requiere Pi. Si se elimina el Pi del medio, el  $\text{Ca}^{2+}$  añadido al medio entra en la mitocondria, pero no se tampona, y por tanto el  $\text{Ca}^{2+}$  libre aumenta rápidamente y alcanza el umbral de apertura de PTP. Podría incluso superar rápidamente el umbral de la CyP-D inhibida. En estas condiciones la inhibición de la CyP-D no tendría ningún efecto inhibitorio en el PTP, como ha observado el grupo de Bernardi (Basso et al., 2008).

Cuando los nucleótidos de adenina se encuentran a alta concentración en la matriz mitocondrial facilitan la formación de precipitados de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi, por lo que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre es más bajo que sin nucleótidos de adenina. El umbral del PTP se alcanza, por tanto, con muchas más adiciones de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio. El segundo umbral también se alcanza con muchas más adiciones, y por eso se siguen observando diferencias entre mitocondrias control y deficientes para transportadores de ATP-Mg/Pi en presencia de CsA (figuras 4.22 y 4.31).



**Figura 5.5. Modelo de la regulación de la capacidad de tamponamiento de calcio y la apertura del PTP.** Cuando se añade  $\text{Ca}^{2+}$  al medio, la mitocondria lo captura y el  $\text{Ca}^{2+}$  libre aumenta en la matriz mitocondrial. En la figura se indican 4 umbrales de  $\text{Ca}^{2+}$  libre distintos de apertura del PTP (líneas de puntos). La flecha roja indica el umbral basal. Si añadimos CAT, el umbral disminuye (ANT en conformación “c”); si añadimos BKA o ADP 0,2 mM el umbral aumenta (ANT en conformación “m”), y lo mismo ocurre si añadimos CsA 5  $\mu\text{M}$  (CyP-D inhibida); finalmente, si añadimos BKA y CsA simultáneamente o ADP y CsA simultáneamente el umbral aumenta mucho más. Mitocondrias del ratón KO para ANT1 y ANT2 estarían permanentemente en la situación ANT en conformación “m”, mientras que mitocondrias del ratón KO para CyP-D estarían permanentemente en la situación +CsA. Las líneas rojas indican como aumentaría el  $\text{Ca}^{2+}$  libre mitocondrial en distintas situaciones. Sin Pi, el  $\text{Ca}^{2+}$  libre no puede tamponarse y aumenta muy rápido superando todos los umbrales. Por eso, la CsA no proporciona mucha protección (Basso et al., 2008). En presencia de alta concentración de *AdN* en la matriz mitocondrial el  $\text{Ca}^{2+}$  estaría muy tamponado, por formación de precipitados  $\text{Ca}^{2+}$ -Pi, por lo cual el  $\text{Ca}^{2+}$  libre aumentaría muy despacio, y se tardará más en alcanzar los umbrales. Nótese las enormes diferencias en la apertura del PTP en presencia de CsA en mitocondrias llenas y vacías de *AdN*.

Los nucleótidos de adenina también pueden modular la apertura del PTP mediante su interacción con los ANT (Zoratti y Szabò, 1995). No parece que este efecto tenga que ver con el tamponamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ , sino con una modificación del umbral de apertura del PTP, al igual que ocurre con la CyP-D. La unión del nucleótido provoca el cambio a la conformación “m” del transportador, al igual que el BKA. Por otro lado, el CAT fija al transportador en la conformación “c”. La conformación “m” retarda la apertura del PTP, mientras que la conformación “c” la acelera. La ausencia del ANT es equivalente a que éste se encuentre en conformación “m”, ya que la apertura del PTP se retarda (Kokoszka et al., 2004). Estudios de modelado molecular han señalado que el  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial se une a las moléculas de cardiolipina que interaccionan con el ANT en la conformación “c” y desestabiliza la unión de la proteína con el fosfolípido (Pestana et al., 2009). En esas condiciones la Cys56 del transportador, localizada en el segmento que une las hélices transmembrana 1 y 2, adquiere mayor movilidad, y posiblemente se vuelve más susceptible de ser atacada por agentes oxidantes (figura 5.6). Se ha sugerido que la Cys56 del ANT es uno de los puntos clave donde ataca el estrés oxidativo, y que cuando es oxidada la proteína se transforma en el canal responsable del PTP (Halestrap et al., 2002). Curiosamente, la presencia de ADP en el sitio de unión del transportador protege contra el aumento de movilidad de la Cys56 inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  (Pestana et al., 2009). Esa protección del residuo de cisteína frente al estrés oxidativo podría ser la causa de que la conformación “m” del transportador retarde la apertura del PTP (figura 5.6). La ausencia completa del transportador elimina esa y otras cisteínas susceptibles de ser oxidadas y proporciona la misma protección que la conformación “m”. Sin embargo, en ausencia del transportador todavía se puede provocar la apertura del PTP cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta más o frente al estrés oxidativo (Kokoszka et al., 2004). Esto pone de manifiesto que cisteínas equivalentes en otros transportadores mitocondriales, como el transportador de fosfato (Leung y Halestrap, 2008), probablemente cumplen el mismo papel que la Cys56 de ANT, y están implicadas en la generación del canal responsable del PTP.



**Figura 5.6. Modelo de los efectos de la conformación de ANT sobre el PTP.** La molécula de ANT está unida a cardiolipinas (CL) de la membrana mitocondrial interna. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a las CL y desestabiliza su unión con el ANT. La cisteína 56 queda disponible para ser atacada por ROS, lo que provoca que ANT se convierta en un canal responsable del PTP. Cuando se une ADP al ANT, se produce un cambio de conformación. Ahora, aunque se une  $\text{Ca}^{2+}$  a las CL, la cisteína está protegida del ataque de ROS. Sin embargo, un aumento grande de ROS y  $\text{Ca}^{2+}$  puede desencadenar el PTP. En ausencia de ANT, que es la proteína mayoritaria de la membrana mitocondrial interna, probablemente otros transportadores mitocondriales unidos a CL sufren modificaciones similares, aunque se requiere más  $\text{Ca}^{2+}$ .



Existe controversia sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre máxima que se alcanza en la matriz mitocondrial. Los grupos que han utilizado sondas fluorescentes como fura-2FF han observado que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre se tampona en torno a 5  $\mu\text{M}$  (Chalmers y Nicholls, 2003), mientras que los grupos que han utilizado sondas luminiscentes como aequorina han observado que se tampona a concentraciones mucho más altas, en torno a 800-1000  $\mu\text{M}$  (Vay et al., 2009). Por consiguiente, también es objeto de debate la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre que se requiere para que se abra el PTP,  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el rango micromolar (Chalmers y Nicholls, 2003) o milimolar (Vay et al., 2009). Una posibilidad es que la diferencia se deba al tipo de mitocondrias utilizadas. Los ensayos con sondas fluorescentes suelen hacerse con mitocondria aislada de hígado y cerebro de ratón o rata (Chalmers y Nicholls, 2003), mientras que los ensayos con aequorina normalmente se han realizado con líneas celulares (HeLa) o células cromafín primarias permeabilizadas (Vay et al., 2009). Cualquiera que fuera la alternativa correcta, el modelo que hemos propuesto de regulación del PTP sería igualmente válido.

#### 2.4) Papel de las SCaMCs en la muerte celular.

La apertura del PTP puede causar la muerte de la célula por necrosis (Baines et al., 2005; Schinzel et al., 2005; Nakagawa et al., 2005). Por ejemplo, en corazón, la muerte causada por episodios de isquemia y reperfusión se debe a la apertura del PTP en los cardiomiocitos. La anoxia que se produce durante la isquemia produce la parada de la respiración, lo que conlleva un aumento transitorio de la glucólisis, y por tanto una acumulación de lactato y bajada del pH (Halestrap y Pasdois, 2009). La acidosis y la falta de nutrientes provocan pronto la inhibición de la glucólisis y la depleción del ATP citosólico. La concentración de  $\text{Pi}$  aumenta a medida que el ATP se hidroliza. Las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática dejan de funcionar, el  $\text{Ca}^{2+}$  se acumula en el citosol, y parte puede entrar en la mitocondria. Sin embargo, la captura mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  requiere  $\Delta\Psi$ , que es muy bajo debido a la parada de la respiración. El PTP no se abre durante la isquemia debido al pH bajo y la poca captura mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (Halestrap y Pasdois, 2009). Por otro lado, durante la reperfusión, la respiración se reanuda, y la llegada de oxígeno provoca un aumento rápido de ROS. El pH del citosol recupera sus valores normales. El aumento del  $\Delta\Psi$  provoca una rápida captura mitocondrial del  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado en el citosol durante la isquemia. La suma de alto  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, pH 7,4, alto  $\text{Pi}$  y ROS provoca la apertura del PTP durante la reperfusión del tejido infartado (Halestrap y Pasdois, 2009). Otros tóxicos, como el lipopolisacárido bacteriano, causan toxicidad y muerte celular en el hígado dependiente de apertura del PTP (Soriano et al., 2004). El PTP también puede contribuir a la muerte celular causada por agentes oxidantes de origen natural (como la divicidina), industrial (como el paracuat) o farmacológico (Zoratti y Szabò, 1995).

Como ya hemos visto, la apertura del PTP en estas situaciones vendrá modulada por la concentración de nucleótidos de adenina en la matriz. Por tanto, SCaMC-3 puede tener influencia en este proceso, al menos en cerebro e hígado, que son los tejidos donde se expresa. Sin embargo, la situación es más complicada que en mitocondria aislada, ya que el transportador es reversible (Aprille, 1988, 1993; Fiermonte et al., 2004). En algunas situaciones, como la isquemia-reperfusión, donde no hay nutrientes ni oxígeno, se puede producir un aumento del  $\text{Pi}$  y una disminución del ATP en el citosol, lo que puede llevar a un intercambio de  $\text{Pi}$  citosólico por ATP mitocondrial, y por consiguiente, a la depleción de los nucleótidos de adenina de la matriz (Lapidus y Sokolove,

1993; Hagen et al., 2003). En este caso, la presencia de SCaMC-3 teóricamente podría empeorar la isquemia, al vaciar la mitocondria de nucleótidos. Sin embargo, si el estado energético de la célula es bueno durante la adición del estímulo tóxico, SCaMC-3 podría ser protector frente a la apertura del PTP, al haber ATP disponible en el citosol para entrar a la mitocondria cuando aumente el  $\text{Ca}^{2+}$ . En nuestro laboratorio se están realizando experimentos preliminares con todos estos modelos.

Por otro lado, hemos demostrado que SCaMC-1 es capaz de proteger a las células 143B y Cos-7 de estímulos tóxicos como el  $\text{H}_2\text{O}_2$  o la generación de ROS por exposición a láser de alta potencia (figuras 4.37 y 4.38). Desde hace tiempo se conoce que las líneas celulares, especialmente las tumorales, son muy resistentes frente a la apoptosis y necrosis. También se sabe que las mitocondrias de células tumorales son capaces de captar y acumular altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  sin sufrir hinchamiento o daños y sin liberar el  $\text{Ca}^{2+}$  acumulado, especialmente en presencia de ATP externo (McIntyre y Bygrave, 1974). Es posible que la alta expresión de SCaMC-1 en líneas celulares o tumores sea uno de los mecanismos que protegen a la célula de los aumentos de  $\text{Ca}^{2+}$  libre mitocondrial, y por tanto del PTP y la muerte necrótica. La presencia de SCaMC-1 en líneas celulares, y su implicación en la alta acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$ , tiene sentido si se tiene en cuenta que la velocidad de transporte de sustrato por molécula de SCaMC-1 en proteoliposomas es unas 8 veces mayor que la velocidad de SCaMC-3 (580 frente a 79  $\mu\text{moles}$  de ATP por minuto por gramo de proteína transportadora, Fiermonte et al., 2004). Por tanto, teniendo en cuenta su alta expresión y su alta velocidad, el transporte de nucleótidos a través de SCaMC-1 en condiciones de alto  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol será enorme y muy rápido, como hemos podido observar en esta tesis (figura 4.30), y eso podría contribuir de manera decisiva al tamponamiento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la matriz mitocondrial durante la exposición a estímulos tóxicos.

Por otra parte, probablemente SCaMC-1 también tiene influencia en otras situaciones fisiológicas de la célula. En esta tesis hemos propuesto que la SCaMC de levadura, Sal1p, tiene un papel importante en suministrar ATP citosólico a la mitocondria. SCaMC-1 podría tener una función similar en líneas celulares y tumores. Al igual que la levadura *S. cerevisiae* cuando crece en presencia de glucosa, muchas células tumorales se caracterizan por un aumento en el consumo de glucosa, un aumento en la formación de lactato y una disminución de la respiración, incluso en condiciones aerobias (Warburg, 1956; Cuezva et al., 2002; Zhang et al., 2007). Además, los tumores y líneas celulares glucolíticas, como las 143B, normalmente sobreexpresan la isoforma 2 del transportador de ADP/ATP, ANT2 (Giraud et al., 1998). Se ha sugerido que esta isoforma funciona preferentemente para importar ATP glucolítico a la mitocondria (Chevrollier et al., 2005), lo que concuerda con lo observado en la levadura, y sugiere la importancia del importe de ATP a la mitocondria en estas circunstancias. En células 143B carentes de  $\text{DNA}_{\text{mit}}$  ( $\rho^0$ ), exclusivamente glucolíticas e incapaces de respirar o de generar ATP por fosforilación oxidativa, la expresión de SCaMC-1 también es muy alta, con niveles similares a los que presenta la línea parental 143B con  $\text{DNA}_{\text{mit}}$  (resultados no mostrados). Es posible que el importe de ATP a través de SCaMC-1 en líneas celulares y tumores sea necesario para el importe y ensamblaje de proteínas citosólicas a la mitocondria, y, en células con  $\text{DNA}_{\text{mit}}$ , para la traducción de proteínas mitocondriales y para el mantenimiento del  $\text{DNA}_{\text{mit}}$ . Por tanto, el mecanismo de captura de nucleótidos de adenina mitocondrial a través de las SCaMCs, y su regulación, puede tener interés para conocer las características bioenergéticas de la célula cancerosa y tal vez para el desarrollo de terapias antitumorales.





## Conclusiones

---



## CONCLUSIONES

1. Las SCaMCs son isoformas del transportador mitocondrial de ATP-Mg/Pi identificado por el grupo de Aprille en los años 80.
2. La proteína Sal1p es el transportador de ATP-Mg/Pi en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su existencia era desconocida en la levadura hasta este trabajo. Transporta ATP-Mg y ADP, y se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial con una  $S_{0.5}$  de 15,0  $\mu\text{M}$ . En ausencia del catión el transporte es nulo. El  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta la  $V_{\text{max}}$  del transporte, pero no el valor de  $K_m$ , que es aproximadamente 0,2 mM para ambos nucleótidos.
3. Sal1p se activa por señales citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  en la levadura, como la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por glucosa en células en fase estacionaria, y proporciona ATP citosólico a la mitocondria. Sal1p y el transportador de ADP/ATP también proporcionan ATP a la mitocondria en levaduras que crecen aeróbicamente con glucosa como fuente de carbono. Probablemente ese ATP es utilizado para el importe y ensamblaje de proteínas en la mitocondria.
4. Sal1p no es esencial para la levadura siempre que esté presente el transportador de ADP/ATP, Aac2p, aunque otros grupos han observado que la ausencia de Sal1p sí puede desestabilizar el *DNA* mitocondrial en determinadas situaciones.
5. La isoforma SCaMC-3/Slc25a23 es el transportador de ATP-Mg/Pi mayoritario en cerebro e hígado de ratón. Se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial con una  $S_{0.5}$  de 3,4  $\mu\text{M}$ . En ausencia del catión el transporte es nulo. Los otros parálogos de las SCaMCs, SCaMC-1 y SCaMC-2, no son capaces de suplir la función transportadora de SCaMC-3 en mitocondria aislada del ratón SCaMC-3/-.
6. La isoforma SCaMC-1/SLC25A24 es el transportador de ATP-Mg/Pi mayoritario en líneas celulares como Cos-7 y 143B. El transporte de ATP o ADP insensible a CAT se activa por  $\text{Ca}^{2+}$  extramitocondrial con una  $S_{0.5}$  de 12,7  $\mu\text{M}$  en mitocondria aislada de células Cos-7.
7. Utilizando sistemas de falta de función, hemos demostrado que SCaMC-1/SLC25A24 y SCaMC-3/Slc25a23 son capaces de modular la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura del PTP en mitocondria aislada de líneas celulares o tejidos respectivamente. La regulación de estos procesos tiene que ver con que los transportadores de ATP-Mg/Pi son capaces de modificar el contenido neto de nucleótidos de adenina de la mitocondria. Un contenido alto de nucleótidos de adenina en la matriz mitocondrial sería capaz de provocar la precipitación de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi en la matriz mitocondrial, con lo que el  $\text{Ca}^{2+}$  libre sería más bajo en estas condiciones. Esto contribuiría a una mayor capacidad de acumular y tamponar  $\text{Ca}^{2+}$  y a una menor apertura del PTP en la mitocondria.

8. La presencia de SCaMC-1/SLC25A24 protege a las líneas celulares Cos-7 y 143B de la muerte celular provocada por especies reactivas de oxígeno (ROS), y por tanto, regularía también la apertura del PTP *in vivo*. SCaMC-1/SLC25A24 podría, por tanto, constituir un mecanismo adicional de protección de las líneas celulares y tumores frente a estímulos tóxicos.

## **Bibliografía**

---



- Abou-Khalil, S., Hanson, J.B. (1979)** Energy-linked Adenosine Diphosphate Accumulation by Corn Mitochondria: I. General Characteristics and Effect of Inhibitors. *Plant Physiol* 64, 276-280.
- Abramov, A.Y., Duchen, M.R. (2008)** Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1777, 953-964.
- Agrimi, G., Di Noia, M.A., Marobbio, C.M., Fiermonte, G., Lasorsa, F.M., Palmieri, F. (2004)** Identification of the human mitochondrial S-adenosylmethionine transporter: bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution. *Biochem J* 379, 183-190.
- Allue, I., Gandelman, O., Dementieva, E., Ugarova, N., Cobbald, P. (1996)** Evidence for rapid consumption of millimolar concentrations of cytoplasmic ATP during rigor-contraction of metabolically compromised single cardiomyocytes. *Biochem J* 319, 463-469.
- Appleby, C.A., Morton, R.K. (1959)** Lactic dehydrogenase and cytochrome b<sub>2</sub> of baker's yeast; purification and crystallization. *Biochem J* 71, 492-499.
- Aprille, J.R. (1988)** Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size in liver: mechanism and metabolic role. *FASEB J* 2, 2547-2556.
- Aprille, J.R. (1993)** Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier. *J Bioenerg Biomembr* 25, 473-481.
- Aprille, J.R., Asimakis, G.K. (1980)** Postnatal development of rat liver mitochondria: state 3 respiration, adenine nucleotide translocase activity, and the net accumulation of adenine nucleotides. *Arch Biochem Biophys* 201, 564-575.
- Aprille, J.R., Austin, J.A. (1981)** Regulation of the mitochondrial adenine nucleotide pool size. *Arch Biochem Biophys* 212, 689-699.
- Arechaga, I., Raimbault, S., Prieto, S., Levi-Meyrueis, C., Zaragoza, P., Miroux, B., Ricquier, D., Bouillaud, F., Rial, E. (1993)** Cysteine residues are not essential for uncoupling protein function. *Biochem J* 296, 693-700.
- Avéret, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M., Guérin, B. (1998)** Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* 184, 67-79.
- Baines, C.P. (2009)** The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* 46, 850-857.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., Molkentin, J.D. (2005)** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658-662.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., Molkentin, J.D. (2007)** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9, 550-555.
- Baker, K.P., Schatz, G. (1991)** Mitochondrial proteins essential for viability mediate protein import into yeast mitochondria. *Nature* 349, 205-208.
- Balaban, R.S. (2009)** The role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1334-1341.

- Bamber, L., Harding, M., Butler, P.J., Kunji, E.R. (2006)** Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 16224-16229.
- Bamber, L., Harding, M., Monné, M., Slotboom, D.J., Kunji, E.R. (2007a)** The yeast mitochondrial ADP/ATP carrier functions as a monomer in mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10830-10834.
- Bamber, L., Slotboom, D.J., Kunji, E.R. (2007b)** Yeast mitochondrial ADP/ATP carriers are monomeric in detergents as demonstrated by differential affinity purification. *J Mol Biol* 371, 388-395.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P. (2005)** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280, 18558-18561.
- Basso, E., Petronilli, V., Forte MA, Bernardi P. (2008)** Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem* 283, 26307-26311.
- Baumgartner, H.K., Gerasimenko, J.V., Thorne, C., Ferdek, P., Pozzan, T., Tepikin, A.V., Petersen, O.H., Sutton, R., Watson, A.J., Gerasimenko, O.V. (2009)** Calcium elevation in mitochondria is the main  $\text{Ca}^{2+}$  requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J Biol Chem* 284, 20796-20803.
- Bernardi, P., Krauskopf, A., Basso, E., Petronilli, V., Blachly-Dyson, E., Di Lisa, F., Forte, M.A. (2006)** The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 273, 2077-2099.
- Bonod-Bidaud, C., Chevrollier, A., Bourasseau, I., Lachaux, A., Mousson de Camaret, B., Stepien, G. (2002)** Induction of ANT2 gene expression in liver of patients with mitochondrial DNA depletion. *Mitochondrion* 1, 217-224.
- Bowers, K., Levi, B.P., Patel, F.I., Stevens, T.H. (2000)** The sodium/proton exchanger Nhx1p is required for endosomal protein trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11: 4277-4294.
- Branchini, B.R., Murtiashaw, M.H., Magyar, R.A., Anderson, S.M. (2000)** The role of lysine 529, a conserved residue of the acyl-adenylate-forming enzyme superfamily, in firefly luciferase. *Biochemistry* 39, 5433-5440.
- Brower, J.V., Rodic, N., Seki, T., Jorgensen, M., Fliess, N., Yachnis, A.T., McCarrey, J.R., Oh, S.P., Terada, N. (2007)** Evolutionarily conserved mammalian adenine nucleotide translocase 4 is essential for spermatogenesis. *J Biol Chem* 282, 29658-29666.
- Cahalan, M.D. (2009)** STIMulating store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. *Nat Cell Biol* 11, 669-677.
- Carafoli, E. (2002)** Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 1115-1122.
- Carafoli, E. (2003)** Historical review: mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci* 28, 175-181.
- Carafoli, E., Balcavage, W.X., Lehninger, A.L., Mattoon, J.R. (1970)**  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism in yeast cells and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 205, 18-26.
- Carafoli, E., Lehninger, A.L. (1971)** A survey of the interaction of calcium ions with mitochondria from different species. *Biochem J* 122, 681-690.



- Carafoli, E., Rossi, C.S., Lehninger, A.L. (1965)** Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of  $\text{Ca}^{++}$  and Phosphate. *J Biol Chem* 240, 2254-2261.
- Castrejón, V., Parra, C., Moreno, R., Peña, A., Uribe, S. (1997)** Potassium collapses the  $\Delta\psi$  in yeast mitochondria while the rate of ATP synthesis is inhibited only partially: modulation by phosphate. *Arch Biochem Biophys* 346, 37-44.
- Cavero, S., Traba, J., del Arco, A., Satrústegui, J. (2005)** The calcium-dependent ATP-Mg/Pi mitochondrial carrier is a target of glucose-induced calcium signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 392, 537-544.
- Cavero, S., Voza, A., del Arco, A., Palmieri, L., Villa, A., Blanco, E., Runswick, M.J., Walker, J.E., Cerdán, S., Palmieri, F., Satrústegui, J. (2003)** Identification and metabolic role of the mitochondrial aspartate-glutamate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 50, 1257-1269.
- Chalmers, S., Nicholls, D.G. (2003)** The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. *J Biol Chem* 278, 19062-19070.
- Chan, K.W., Slotboom, D.J., Cox, S., Embley, T.M., Fabre, O., van der Giezen, M., Harding, M., Horner, D.S., Kunji, E.R., León-Avila, G., Tovar, J. (2005)** A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Curr Biol* 15, 737-742.
- Chávez, E., Rodríguez, J.S., García, G., García, N., Correa, F. (2005)** Oligomycin strengthens the effect of cyclosporin A on mitochondrial permeability transition by inducing phosphate uptake. *Cell Biol Int* 29, 551-558.
- Chen, X.J. (2004)** Sal1p, a calcium-dependent carrier protein that suppresses an essential cellular function associated with the Aac2 isoform of ADP/ATP translocase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 167, 607-617.
- Chen, X.J., Clark-Walker, G.D. (1999)** The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol* 194, 197-238.
- Chevrollier, A., Loiseau, D., Chabi, B., Renier, G., Douay, O., Malthiery, Y., Stepien, G. (2005)** ANT2 isoform required for cancer cell glycolysis. *J Bioenergetics Biomembranes* 37, 307-316.
- Chiesa, A., Rapizzi, E., Tosello, V., Pinton, P., de Virgilio, M., Fogarty, K.E., Rizzuto, R. (2001)** Recombinant aequorin and green fluorescent protein as valuable tools in the study of cell signalling. *Biochem J* 355, 1-12.
- Choi, S.W., Gerencser, A.A., Nicholls, D.G. (2009)** Bioenergetic analysis of isolated cerebrocortical nerve terminals on a microgram scale: spare respiratory capacity and stochastic mitochondrial failure. *J Neurochem* 109, 1179-1191.
- Clark-Walker, G.D. (2003)** Kinetic properties of F1-ATPase influence the ability of yeasts to grow in anoxia or absence of mtDNA. *Mitochondrion* 2, 257-265.
- Clark-Walker, G.D., Chen, X.J. (2001)** Dual mutations reveal interactions between components of oxidative phosphorylation in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 159, 929-938.
- Contreras, L., Gómez-Puertas, P., Iijima, M., Kobayashi, K., Saheki, T., Satrústegui, J. (2007)**  $\text{Ca}^{2+}$  Activation kinetics of the two aspartate-glutamate mitochondrial carriers, aralar and citrin: role in the heart malate-aspartate NADH shuttle. *J Biol Chem* 282, 7098-7106.

- Contreras, L., Satrústegui, J. (2009)** Calcium signaling in brain mitochondria: interplay of malate aspartate NADH shuttle and calcium uniporter/mitochondrial dehydrogenase pathways. *J Biol Chem* 284, 7091-7099.
- Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., Reed, J.C. (2002)** The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62, 6674-6681.
- Daum, G., Böhni, P.C., Schatz, G. (1982)** Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13028-13033.
- De Marcos Lousa, C., Trézéguet, V., Dianoux, A.C., Brandolin, G., Lauquin, G.J. (2002)** The human mitochondrial ADP/ATP carriers: kinetic properties and biogenesis of wild-type and mutant proteins in the yeast *S. cerevisiae*. *Biochemistry* 41, 14412-14420.
- del Arco, A. (2005)** Novel variants of human SCA<sub>MC-3</sub>, an isoform of the ATP-Mg/P(i) mitochondrial carrier, generated by alternative splicing from 3'-flanking transposable elements. *Biochem J* 389, 647-655.
- del Arco, A., Agudo, M., Satrústegui, J. (2000)** Characterization of a second member of the subfamily of calcium-binding mitochondrial carriers expressed in human non-excitabile tissues. *Biochem J* 345, 725-732.
- del Arco, A., Satrústegui, J. (1998)** Molecular cloning of Aralar, a new member of the mitochondrial carrier superfamily that binds calcium and is present in human muscle and brain. *J Biol Chem* 273, 23327-23334.
- del Arco, A., Satrústegui, J. (2004)** Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *J Biol Chem* 279, 24701-24713.
- del Arco, A., Satrústegui, J. (2005)** New mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* 62, 2204-2227.
- Demaurex, N., Poburko, D., Frieden, M. (2009)** Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1383-1394.
- Dimitrov, L.N., Brem, R.B., Kruglyak, L., Gottschling, D.E. (2009)** Polymorphisms in multiple genes contribute to the spontaneous mitochondrial genome instability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C strains. *Genetics* 183, 365-383.
- Dolce, V., Scarcia, P., Iacopetta, D., Palmieri, F. (2005)** A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution. *FEBS Lett* 579, 633-637.
- Drgon, T., Sabova, L., Nelson, N., Kolarov, J. (1991)** ADP/ATP translocator is essential only for anaerobic growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 289, 159-162.
- Duchen, M.R., Leyssens, A., Crompton, M. (1998)** Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes. *J Cell Biol* 142, 975-988.
- Duchen, M.R. (2000)** Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28, 339-348.

- Dupont, C.H., Mazat, J.P., Guerin, B. (1985)** The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from rho + and rho degree strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 132, 1116-1123.
- Eliseev, R.A., Filippov, G., Velos, J., VanWinkle, B., Goldman, A., Rosier, R.N., Gunter, T.E. (2007)** Role of cyclophilin D in the resistance of brain mitochondria to the permeability transition. *Neurobiol Aging* 28, 1532-1542.
- Fiermonte, G., De Leonardis, F., Todisco, S., Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Palmieri, F. (2004)** Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem* 279, 30722-30730.
- Fiermonte, G., Dolce, V., Arrigoni, R., Runswick, M.J., Walker, J.E., Palmieri, F. (1999)** Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem J* 344, 953-960.
- Fiermonte, G., Dolce, V., David, L., Santorelli, F.M., Dionisi-Vici, C., Palmieri, F., Walker, J.E. (2003)** The mitochondrial ornithine transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 278, 32778-32783.
- Fiermonte, G., Dolce, V., Palmieri, L., Ventura, M., Runswick, M.J., Palmieri, F., Walker, J.E. (2001)** Identification of the human mitochondrial oxodicarboxylate carrier. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, tissue distribution, and chromosomal location. *J Biol Chem* 276, 8225-8230.
- Fiermonte, G., Palmieri, L., Todisco, S., Agrimi, G., Palmieri, F., Walker, J.E. (2002)** Identification of the mitochondrial glutamate transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization and tissue distribution of two human isoforms. *J Biol Chem* 277, 19289-19294.
- Fiermonte, G., Paradies, E., Todisco, S., Marobbio, C.M., Palmieri, F. (2009)** A novel member of solute carrier family 25 (SLC25A42) is a transporter of coenzyme a and adenosine 3',5'-diphosphate in human mitochondria. *J Biol Chem* 284, 18152-18159.
- Floyd, S., Favre, C., Lasorsa, F.M., Leahy, M., Trigiant, G., Stroebel, P., Marx, A., Loughran, G., O'Callaghan, K., Marobbio, C.M., Slotboom, D.J., Kunji, E.R., Palmieri, F., O'Connor, R. (2007)** The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. *Mol Biol Cell* 18, 3545-3555.
- Frederick, R.L., McCaffery, J.M., Cunningham, K.W., Okamoto, K., Shaw, J.M. (2004)** Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* 167, 87-98.
- Gajewski, C.D., Yang, L., Schon, E.A., Manfredi, G. (2002)** New insights into the bioenergetics of mitochondrial disorders using intracellular ATP reporters. *Mol Biol Cell* 14, 3628-3635.
- Gbelská, Y., Subík, J., Svoboda, A., Goffeau, A., Kovác, L. (1983)** Intramitochondrial ATP and cell functions: yeast cells depleted of intramitochondrial ATP lose the ability to grow and multiply. *Eur J Biochem* 130, 281-286.
- Gehrich, S.C., Aprille, J.R. (1988)** Hepatic gluconeogenesis and mitochondrial function during hibernation. *Comp Biochem Physiol B* 91, 11-16.

- Gillies, R.J., Ugurbil, K., den Hollander, J.A., Shulman, R.G. (1981)**  $^{31}\text{P}$  NMR studies of intracellular pH and phosphate metabolism during cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 78, 2125-2129
- Giraud, S., Bonod-Bidaud, C., Wesolowski-Louvel, M., Stepien, G. (1998)** Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria. J Mol Biol 281, 409-418
- Gizatullina, Z.Z., Chen, Y., Zierz, S., Gellerich, F.N. (2005)** Effects of extramitochondrial ADP on permeability transition of mouse liver mitochondria. Biochim Biophys Acta 1706, 98-104.
- Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R., Wallace, D.C. (1997)** A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. Nat Genet 16, 226-234.
- Granot, D., Snyder, M. (1991)** Glucose induces cAMP-independent growth-related changes in stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci USA 88, 5724-5728.
- Granot, D., Snyder, M. (1993)** Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. Yeast 9, 465-479.
- Greenawalt, J.W., Rossi, C.S., Lehninger, A.L. (1964)** Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. J Cell Biol 23, 21-38.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985)** A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 260, 3440-3450.
- Guerin, B., Bukusoglu, C., Rakotomanana, F., Wohlrab, H. (1990)** Mitochondrial phosphate transport. N-ethylmaleimide insensitivity correlates with absence of beef heart-like Cys42 from the *Saccharomyces cerevisiae* phosphate transport protein. J Biol Chem 265, 19736-19741.
- Guernsey, D.L., Jiang, H., Campagna, D.R., Evans, S.C., Ferguson, M., Kellogg, M.D., Lachance, M., Matsuoka, M., Nightingale, M., Rideout, A., Saint-Amant, L., Schmidt, P.J., Orr, A., Bottomley, S.S., Fleming, M.D., Ludman, M., Dyack, S., Fernandez, C.V., Samuels, M.E. (2009)** Mutations in mitochondrial carrier family gene SLC25A38 cause nonsyndromic autosomal recessive congenital sideroblastic anemia. Nat Genet 41, 651-653.
- Gunter, K.K., Gunter, T.E. (1994)** Transport of calcium by mitochondria. J Bioenerg Biomembr 26, 471-485.
- Gunter, T.E., Pfeiffer, D.R. (1990)** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. Am J Physiol 258, C755-786.
- Gutiérrez-Aguilar, M., Pérez-Vázquez, V., Bunoust, O., Manon, S., Rigoulet, M., Uribe, S. (2007)** In yeast,  $\text{Ca}^{2+}$  and octylguanidine interact with porin (VDAC) preventing the mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta 1767, 1245-1251.
- Hagen, T., Lagace, C.J., Modica-Napolitano, J.S., Aprille, J.R. (2003)** Permeability transition in rat liver mitochondria is modulated by the ATP-Mg/Pi carrier. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G274-281.
- Haguenauer, A., Raimbault, S., Masscheleyn, S., Gonzalez-Barroso, M.M., Criscuolo, F., Plamondon, J., Miroux, B., Ricquier, D., Richard, D., Bouillaud, F., Pecqueur, C. (2005)** A

- new renal mitochondrial carrier, KMCP1, is up-regulated during tubular cell regeneration and induction of antioxidant enzymes. *J Biol Chem* 280, 22036-22043.
- Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T., Fredriksson, R. (2006)** Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* 88, 779-790.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J. (2002)** The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166.
- Halestrap, A.P., Pasdois, P. (2009)** The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1402-1415.
- Halestrap, A.P., Woodfield, K.Y., Connern, C.P. (1997)** Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272, 3346-3354.
- Hampl, V., Silberman, J.D., Stechmann, A., Diaz-Triviño, S., Johnson, P.J., Roger, A.J. (2008)** Genetic evidence for a mitochondriate ancestry in the 'amitochondriate' flagellate *Trimastix pyriformis*. *PLoS ONE* 3, e1383.
- Hatanaka, T., Hashimoto, M., Majima, E., Shinohara, Y., Terada, H. (1999)** Functional expression of the tandem-repeated homodimer of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 726-730.
- Haynes, R.C., Picking, R.A., Zaks, W.J. (1986)** Control of mitochondrial content of adenine nucleotides by submicromolar calcium concentrations and its relationship to hormonal effects. *J Biol Chem* 261, 16121-16125.
- Huang, S.G., Odoy, S., Klingenberg, M. (2001)** Chimers of two fused ADP/ATP carrier monomers indicate a single channel for ADP/ATP transport. *Arch Biochem Biophys* 394, 67-75.
- Huizing, M., Iacobazzi, V., Ijlst, L., Savelkoul, P., Ruitenbeek, W., van den Heuvel, L., Indiveri, C., Smeitink, J., Trijbels, F., Wanders, R., Palmieri, F. (1997)** Cloning of the human carnitine-acylcarnitine carrier cDNA and identification of the molecular defect in a patient. *Am J Hum Genet* 61, 1239-1245.
- Hurt, E.C., Pesold-Hurt, B., Suda, K., Oppliger, W., Schatz, G. (1985)** The first twelve amino acids (less than half of the pre-sequence) of an imported mitochondrial protein can direct mouse cytosolic dihydrofolate reductase into the yeast mitochondrial matrix. *EMBO J* 4, 2061-2068.
- Hüser, J., Rechenmacher, C.E., Blatter, L.A. (1998)** Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophys J* 74, 2129-2137.
- Jalil, M.A., Begum, L., Contreras, L., Pardo, B., Iijima, M., Li, M.X., Ramos, M., Mármol, P., Horiuchi, M., Shimotsu, K., Nakagawa, S., Okubo, A., Sameshima, M., Isashiki, Y., del Arco, A., Kobayashi, K., Satrustegui, J., Saheki, T. (2005)** Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *J Biol Chem* 280, 31333-31339.
- Jiang, D., Zhao, L., Clapham, D.E. (2009)** Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science* 326, 144-147.
- Johnston, M. (1999)** Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15, 29-33.



- Jouaville, L.S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G.A., Rizzuto, R. (1999)** Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13807-13812.
- Joyal, J.L., Aprille, J.R. (1992)** The ATP-Mg/Pi carrier of rat liver mitochondria catalyzes a divalent electroneutral exchange. *J Biol Chem* 267, 19198-19203.
- Jung, D.W., Bradshaw, P.C., Pfeiffer, D.R. (1997)** Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 272, 21104-21112.
- Kaplan, R.S., Mayor, J.A., Wood, D.O. (1993)** The mitochondrial tricarboxylate transport protein. cDNA cloning, primary structure and comparison with other mitochondrial transport proteins. *J Biol Chem* 268, 13682-13690.
- Kennedy, H., Pouli, A.E., Ainscow, E.K., Jouaville, L.S., Rizzuto, R., Rutter, G.A. (1999)** Glucose generates sub-plasma membrane ATP microdomains in single islet beta-cells. Potential role for strategically located mitochondria. *J Biol Chem* 274: 13281-13291.
- Klingenberg, M. (2008)** The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1978-2021.
- Kobayashi, K., Sinasac, D.S., Iijima, M., Boright, A.P., Begum, L., Lee, J.R., Yasuda, T., Ikeda, S., Hirano, R., Terazono, H., Crackower, M.A., Kondo, I., Tsui, L.C., Scherer, S.W., Saheki, T. (1999)** The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet* 22, 159-163.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., Or, E. (2000)** Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* 20, 1187-1193.
- Kokoszka, J.E., Waymire, K.G., Levy, S.E., Sligh, J.E., Cai, J., Jones, D.P., MacGregor, G.R., Wallace, D.C. (2004)** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 427, 461-465.
- Kolisek, M., Zsurka, G., Samaj, J., Weghuber, J., Schweyen, R.J., Schweigel, M. (2003)** Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg<sup>2+</sup> influx system in mitochondria. *EMBO J* 22, 1235-1244.
- Koop, A., Cobbold, P.H. (1993)** Continuous bioluminescent monitoring of cytoplasmic ATP in single isolated rat hepatocytes during metabolic poisoning. *Biochem J* 295: 165-170.
- Kristián, T., Pivovarova, N.B., Fiskum, G., Andrews, S.B. (2007)** Calcium-induced precipitate formation in brain mitochondria: composition, calcium capacity, and retention. *J Neurochem* 102, 1346-1356.
- Kristián, T., Weatherby, T.M., Bates, T.E., Fiskum, G. (2002)** Heterogeneity of the calcium-induced permeability transition in isolated non-synaptic brain mitochondria. *J Neurochem* 83, 1297-1308.
- Kucejova, B., Li, L., Wang, X., Giannattasio, S., Chen, X.J. (2008)** Pleiotropic effects of the yeast Sal1 and Aac2 carriers on mitochondrial function via an activity distinct from adenine nucleotide transport. *Mol Genet Genomics* 280, 25-39.
- Kunji, E. R. (2004)** The role and structure of mitochondrial carriers. *FEBS Lett.* 564, 239-244.

- Kunji, E.R., Robinson, A.J. (2006)** The conserved substrate binding site of mitochondrial carriers. *Biochim Biophys Acta* 1757, 1237-1248.
- Lagunas, R. (1976)** Energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* discrepancy between ATP balance and known metabolic functions. *Biochim Biophys Acta* 440, 661-674.
- Lagunas, R. (1979)** Energetic irrelevance of aerobiosis for *S. cerevisiae* growing on sugars. *Mol Cell Biochem* 27, 139-146.
- Lagunas, R., Domínguez, C., Busturia, A., Saenz, M.J. (1982)** Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J Bacteriol* 152, 19-25.
- Lapidus, R.G., Sokolove, P.M. (1994)** Spermine inhibition of the permeability transition of isolated rat liver mitochondria: an investigation of mechanism. *Arch Biochem Biophys* 306, 246-253.
- Lawson, J.E., Douglas, M.G. (1988)** Separate genes encode functionally equivalent ADP/ATP carrier proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation and analysis of AAC2. *J Biol Chem* 263, 14812-14818.
- Ledesma, A., de Lacoba, M.G., Rial, E. (2002)** The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 3, reviews3015.1–3015.9.
- Lefebvre-Legendre, L., Balguerie, A., Duvezin-Caubet, S., Giraud, M.F., Slonimski, P.P., di Rago, J.P. (2003)** F1-catalysed ATP hydrolysis is required for mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* growing under conditions where it cannot respire. *Mol Microbiol* 47, 1329-1339.
- Leung, A.W., Halestrap, A.P. (2008)** Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* 1777, 946-952.
- Leskinen, P., Virta, M., Karp, M. (2003)** One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. *Yeast* 20, 1109-1113.
- Li, V., Brustovetsky, T., Brustovetsky, N. (2009)** Role of cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition in glutamate-induced calcium deregulation and excitotoxic neuronal death. *Exp Neurol* 218, 171-182.
- Lill, R., Mühlenhoff, U. (2008)** Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 669-700.
- Lindhurst, M.J., Fiermonte, G., Song, S., Struys, E., De Leonardis, F., Schwartzberg, P.L., Chen, A., Castegna, A., Verhoeven, N., Mathews, C.K., Palmieri, F., Biesecker, L.G. (2006)** Knockout of *Slc25a19* causes mitochondrial thiamine pyrophosphate depletion, embryonic lethality, CNS malformations, and anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 15927-15932.
- Macaskill, A.F., Rinholm, J.E., Twelvetrees, A.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Muir, J., Fransson, A., Aspenstrom, P., Attwell, D., Kittler, J.T. (2009)** Miro1 is a calcium sensor for glutamate receptor-dependent localization of mitochondria at synapses. *Neuron* 61, 541-555.
- Maechler, P., Wang, H., Wollheim, C.B. (1998)** Continuous monitoring of ATP levels in living insulin secreting cells expressing cytosolic firefly luciferase. *FEBS Lett* 422, 328-332.
- Manon, S., Guérin, M. (1998)** Investigation of the yeast mitochondrial unselective channel in intact and permeabilized spheroplasts. *Biochem Mol Biol Int* 44, 565-575.

- Manon, S., Roucou, X., Guérin, M., Rigoulet, M., Guérin, B. (1998)** Characterization of the yeast mitochondria unselective channel: a counterpart to the mammalian permeability transition pore? *J Bioenerg Biomembr* 30, 419-429.
- Mao, W., Yu, X.X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S.W., Adams, S.H., Pan, G. (2009)** UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 443, 326-330.
- Mármol, P., Pardo, B., Wiederkehr, A., del Arco, A., Wollheim, C.B., Satrústegui, J. (2009)** Requirement for aralar and its  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites in  $\text{Ca}^{2+}$  signal transduction in mitochondria from INS-1 clonal beta-cells. *J Biol Chem* 284, 515-524.
- Marshansky, V.N., Novgorodov, S.A., Yaguzhinsky, L.S. (1983)** The role of lipid peroxidation in the induction of cation transport in rat liver mitochondria. The antioxidant effect of oligomycin and dicyclohexylcarbodiimide. *FEBS Lett* 158, 27-30.
- Matlib, M.A., Shannon, W.A. Jr, Srere P.A. (1977)** Measurement of matrix enzyme activity in isolated mitochondria made permeable with toluene. *Arch Biochem Biophys* 178, 396-407.
- McIntyre, H.J., Bygrave, F.L. (1974)** Retention of calcium by mitochondria isolated from Ehrlich ascites tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 165, 744-748.
- Minamikawa, T., Sriratana, A., Williams, D.A., Bowser, D.N., Hill, J.S., Nagley, P. (1999)** Chloromethyl-X-rosamine (MitoTracker Red) photosensitises mitochondria and induces apoptosis in intact human cells. *J Cell Sci* 112, 2419-2430.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y. (2005)** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.
- Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F.I., Anraku, Y. (1991)** Monitoring of intracellular calcium in *Saccharomyces cerevisiae* with an apoaequorin cDNA expression system. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 6878-6882.
- Nakazawa, T., Nunokawa, T. (1977)** Energy transduction and adenine nucleotides in mitochondria from rat liver after hypoxic perfusion. *J Biochem* 82, 1575-1583.
- Navon, G., Shulman, R.G., Yamane, T., Eccleshall, T.R., Lam, K-B., Boronofsky, J.J., Marmur, J. (1979)** Phosphorous-31 nuclear magnetic resonance studies in wild type and glycolytic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 18, 4487-4499.
- Nichols, B.J., Rigoulet, M., Denton, R.M. (1994)** Comparison of the effects of  $\text{Ca}^{2+}$ , adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial  $\text{NAD}^{+}$ -isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. *Biochem J* 303, 461-465.
- Nicholls, D.G., Chalmers, S. (2004)** The integration of mitochondrial calcium transport and storage. *J Bioenerg Biomembr* 36, 277-281.
- Nosek, M.T., Dransfield, D.T., Aprille, J.R. (1990)** Calcium stimulates ATP-Mg/Pi carrier activity in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 265, 8444-8450.
- Osorio, H. Silles, E., Maia, R., Peleteiro, B., Moradas-Ferreira, P., Günther-Sillero, M.A., Sillero, A. (2005)** Influence of chronological aging on the survival and nucleotide content of *Saccharomyces cerevisiae* cells grown in different conditions: occurrence of a high concentration of UDP-N-acetylglucosamine in stationary cells grown in 2% glucose. *FEMS Yeast Res* 5, 387-398.



- Palmieri, F. (2004)** The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. *Pflugers Arch* 447, 689-709.
- Palmieri, F. (2008)** Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: A review. *Biochim Biophys Acta* 1777, 564-578.
- Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F.M., del Arco, A., Kobayashi, K., Iijima, M., Runswick, M.J., Walker, J.E., Saheki, T., Satrústegui, J., Palmieri, F. (2001)** Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J* 20, 5060-5069.
- Pardo, B., Contreras, L., Serrano, A., Ramos, M., Kobayashi, K., Iijima, M., Saheki, T., Satrústegui, J. (2006)** Essential role of aralar in the transduction of small Ca<sup>2+</sup> signals to neuronal mitochondria. *J Biol Chem* 281, 1039-1047.
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trézéguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. (2003)** Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426, 39-44.
- Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., Rizzuto, R., Di Virgilio, F. (2005)** A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion. *Mol Biol Cell* 16, 3659-3665.
- Pérez-Vázquez, V., Saavedra-Molina, A., Uribe, S. (2003)** In *Saccharomyces cerevisiae*, cations control the fate of the energy derived from oxidative metabolism through the opening and closing of the yeast mitochondrial unselective channel. *J Bioenerg Biomembr* 35, 231-241.
- Pestana, C.R., Silva, C.H., Pardo-Andreu, G.L., Rodrigues, F.P., Santos, A.C., Uyemura, S.A., Curti, C. (2009)** Ca(2+) binding to c-state of adenine nucleotide translocase (ANT)-surrounding cardiolipins enhances (ANT)-Cys(56) relative mobility: a computational-based mitochondrial permeability transition study. *Biochim Biophys Acta* 1787, 176-182.
- Phelps, A., Wohlrab, H. (2004)** Homodimeric mitochondrial phosphate transport protein. Transient subunit/subunit contact site between the transport relevant transmembrane helices A. *Biochemistry* 43, 6200-6207.
- Pivovarova, N.B., Stanika, R.I., Watts, C.A., Brantner, C.A., Smith, C.L., Andrews, S.B. (2008)** Reduced calcium-dependent mitochondrial damage underlies the reduced vulnerability of excitotoxicity-tolerant hippocampal neurons. *J Neurochem* 104, 1686-1699.
- Prieto, S., Bouillaud, F., Rial, E. (1995)** The mechanism for the ATP-induced uncoupling of respiration in mitochondria of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Biochem J* 307, 657-661.
- Prieto, S., Bouillaud, F., Ricquier, D., Rial, E. (1992)** Activation by ATP of a proton-conducting pathway in yeast mitochondria. *Eur J Biochem* 208, 487-491.
- Rehling, P., Brandner, K., Pfanner, N. (2004)** Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 519-530.
- Robinson, A.J., Kunji, E.R. (2006)** Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2617-2622.
- Robinson, A.J., Overy, C., Kunji, E.R. (2008)** The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 17766-17771
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. (2002)** Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2, 183-201.

- Roucou, X., Manon, S., Guérin, M. (1997)** Conditions allowing different states of ATP- and GDP-induced permeability in mitochondria from different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1324, 120-132.
- Ruiz, F., Álvarez, G., Ramos, M., Hernández, M., Bogónez, E., Satrústegui, J. (2000)** Cyclosporin A targets involved in protection against glutamate excitotoxicity. *Eur J Pharmacol* 404, 29-39.
- Runswick, M.J., Powell, S.J., Nyren, P., Walker, J.E. (1987)** Sequence of the bovine mitochondrial phosphate carrier protein: structural relationship to ADP/ATP translocase and the brown fat mitochondria uncoupling protein. *EMBO J* 6, 1367-1373.
- Runswick, M.J., Walker, J.E., Bisaccia, F., Iacobazzi, V., Palmieri, F. (1990)** Sequence of the bovine 2-oxoglutarate/malate carrier protein: structural relationship to other mitochondrial transport proteins. *Biochemistry* 29, 11033-11040.
- Sanchis, D., Fleury, C., Chomiki, N., Goubert, M., Huang, Q., Neverova, M., Grégoire, F., Easlick, J., Raimbault, S., Lévi-Meyrueis, C., Miroux, B., Collins, S., Seldin, M., Richard, D., Warden, C., Bouillaud, F., Ricquier, D. (1998)** BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 273, 34611-34615.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., Hajnóczky, G. (2008)** Bidirectional  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 20728-20733.
- Saris, N.E., Carafoli, E. (2005)** A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 70, 187-194.
- Satrústegui, J., Pardo, B., del Arco, A. (2007)** Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 87, 29-67.
- Shaw, G.C., Cope, J.J., Li, L., Corson, K., Hersey, C., Ackermann, G.E., Gwynn, B., Lambert, A.J., Wingert, R.A., Traver, D., Trede, N.S., Barut, B.A., Zhou, Y., Minet, E., Donovan, A., Brownlie, A., Balzan, R., Weiss, M.J., Peters, L.L., Kaplan, J., Zon, L.I., Paw, B.H. (2006)** Mitoferrin is essential for erythroid iron assimilation. *Nature* 440, 96-100.
- Schiestl, R.H., Gietz, R.D. (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* 16, 339-346.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., Korsmeyer, S.J. (2005)** Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12005-12010.
- Schnauffer, A., Clark-Walker, G.D., Steinberg, A.G., Stuart, K. (2005)** The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO J* 24, 4029-4040.
- Sekoguchi, E., Sato, N., Yasui, A., Fukada, S., Nimura, Y., Aburatani, H., Ikeda, K., Matsuura, A. (2003)** A novel mitochondrial carnitine-acylcarnitine translocase induced by partial hepatectomy and fasting. *J Biol Chem* 278, 38796-38802.
- Sinasac, D.S., Moriyama, M., Jalil, M.A., Begum, L., Li, M.X., Iijima, M., Horiuchi, M., Robinson, B.H., Kobayashi, K., Saheki, T., Tsui, L.C. (2004)** Slc25a13-knockout mice harbor metabolic

- deficits but fail to display hallmarks of adult-onset type II citrullinemia. *Mol Cell Biol* 24, 527-536.
- Smith, C.P., Thorsness, P.E. (2008)** The Molecular Basis for Relative Physiological Functionality of the ADP/ATP Carrier Isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 179, 1285-1299.
- Sommer, J.M., Cheng, Q.L., Keller, G.A. and Wang, C.C. (1992)** In vivo import of firefly luciferase into the glycosomes of *Trypanosoma brucei* and mutational analysis of the C-terminal targeting signal. *Mol Biol Cell* 3, 749-759.
- Soriano, M.E., Nicolosi, L., Bernardi, P. (2004)** Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin a prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J Biol Chem* 279, 36803-36808.
- Spaan, A.N., Ijlst, L., van Roermund, C.W., Wijburg, F.A., Wanders, R.J., Waterham, H.R. (2005)** Identification of the human mitochondrial FAD transporter and its potential role in multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 86, 441-447.
- Srere, P. (1969)** Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13, 3-11.
- Stanika, R.I., Pivovarova, N.B., Brantner, C.A., Watts, C.A., Winters, C.A., Andrews, S.B. (2009)** Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 9854-9859.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., Roger, A.J. (2008)** Organelles in Blastocystis that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol* 18, 580-585.
- Stepien, G., Torroni, A., Chung, A.B., Hodge, J.A., Wallace, D.C. (1992)** Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 267, 14592-14597.
- St-Pierre, J., Brand, M.D., Boutilier, R.G. (2000)** Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 8670-8674.
- Szabadkai, G., Duchen, M.R. (2008)** Mitochondria: the hub of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Physiology (Bethesda)* 23, 84-94.
- Thomas, A.P., Denton, R.M. (1986)** Use of toluene-permeabilized mitochondria to study the regulation of adipose tissue pyruvate dehydrogenase in situ. Further evidence that insulin acts through stimulation of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. *Biochem J* 238, 93-101.
- Tisi, R., Baldassa, S., Belotti, F., Martegani, E. (2002)** Phospholipase C is required for glucose-induced calcium influx in budding yeast. *FEBS Lett* 520, 133-138.
- Tisi, R., Belotti, F., Wera, S., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Martegani, E. (2004)** Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. *Curr Genet* 45, 83-89.
- Theobald, U., Mailinger, W., Reuss, M., Rizzi, M. (1993)** In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. *Anal Biochem* 214, 31-37.
- Tökés-Füzesi, M., Bedwell, D.M., Repa, I., Sipos, K., Sümegi, B., Rab, A., Miseta, A. (2002)** Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 44, 1299-1308.

- Traba, J., Froschauer, E.M., Wiesenberger, G., Satrústegui, J., del Arco, A. (2008)** Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol Microbiol* 69, 570-585.
- Traba, J., Satrústegui, J., del Arco, A. (2009a)** Characterization of SCaMC-3-like/slc25a41, a novel calcium-independent mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier. *Biochem J* 418, 125-33.
- Traba, J., Satrústegui, J., del Arco, A. (2009b)** Transport of adenine nucleotides in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: Interactions between the ADP/ATP carriers and the ATP-Mg/Pi carrier. *Mitochondrion* 9, 79-85.
- Trópia, M.J., Cardoso, A.S., Tisi, R., Fietto, L.G., Fietto, J.L., Martegani, E., Castro, I.M., Brandão, R.L. (2006)** Calcium signaling and sugar-induced activation of plasma membrane H(+)-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 1234-1243.
- Valcarce, C., Navarrete, R.M., Encabo, P., Loeches, E., Satrústegui, J., Cuezva, J.M. (1988)** Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263, 7767-7775.
- van der Giezen, M., Slotboom, D.J., Horner, D.S., Dyal, P.L., Harding, M., Xue, G.P., Embley, T.M., Kunji, E.R. (2002)** Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. *EMBO J* 21, 572-579.
- Vay, L., Hernández-SanMiguel, E., Lobatón, C.D., Moreno, A., Montero, M., Alvarez, J. (2009)** Mitochondrial free [Ca<sup>2+</sup>] levels and the permeability transition. *Cell Calcium* 45, 243-250.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., Ariño, J. (2004)** Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 43614-43624.
- Visser, W.F., van Roermund, C.W., Waterham, H.R., Wanders R.J. (2002)** Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 494-497.
- Vitorica, J., Satrústegui, J. (1985)** The role of ADP in the modulation of the calcium-efflux pathway in rat brain mitochondria. *Biochem J* 225, 41-49.
- Voncken, F., Boxma, B., Tjaden, J., Akhmanova, A., Huynen, M., Verbeek, F., Tielens, A.G., Haferkamp, I., Neuhaus, H.E., Vogels, G., Veenhuis, M., Hackstein, J.H. (2002)** Multiple origins of hydrogenosomes: functional and phylogenetic evidence from the ADP/ATP carrier of the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. *Mol Microbiol.* 44, 1441-1454.
- Wang, X., Schwarz, T.L. (2009)** The mechanism of Ca<sup>2+</sup> -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163-174.
- Wang, Y., Tajkhorshid, E. (2008)** Electrostatic funnelling of substrate in mitochondrial inner membrane carriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 9598-9603.
- Warburg, O. (1956)** On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Weinbach, E.C., von Brand, T. (1965)** The isolation and composition of dense granules from Ca<sup>++</sup>-loaded mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 19, 133-137.
- Wibom, R., Lasorsa, F.M., Tökönen, V., Barbaro, M., Sterky, F.H., Kucinski, T., Naess, K., Jonsson, M., Pierri, C.L., Palmieri, F., Wedell, A. (2009)** AGC1 deficiency associated with global cerebral hypomyelination. *N Engl J Med* 361, 489-495.

- Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G. (1996)** Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* 6, 1426-1434.
- Wojtczak, A.B., Davis-van Thienen, W.I. (1987)** Stimulation of mitochondrial functions by glucagon treatment, starvation and by treatment of isolated mitochondria with glycogen-bound enzymes. *Int J Biochem* 19, 479-482.
- Wu, M., Neilson, A., Swift, A.L., Moran, R., Tamagnine, J., Parslow, D., Armistead, S., Lemire, K., Orrell, J., Teich, J., Chomicz, S., Ferrick, D.A. (2007)** Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C125–C136.
- Zako, T., Ayabe, K., Aburatani, T., Kamiya, N., Kitayama, A., Ueda, H., Nagamune, T. (2003)** Luminescent and substrate binding activities of firefly luciferase N-terminal domain. *Biochim Biophys Acta* 1649: 183-189.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., Semenza, G.L. (2007)** HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11: 407-20.
- Zoratti, M., Szabò, I. (1995)** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-176.
- Zúniga, S., Boskovic, J., Jiménez, A., Ballesta, J.P. Remacha, M. (1999)** Disruption of six *Saccharomyces cerevisiae* novel genes and phenotypic analysis of the deletants. *Yeast* 15, 945-953.